



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง โรคไมโครสปอริเดียในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Microsporidiosis in Cultured Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*
Boone, 1931)

นามผู้วิจัย นายสาธิต ประเสริฐศรี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิมสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

โรคไมโครสปอริเดียมในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Microsporidiosis in Cultured Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

โดย

นายสาริต ประเสริฐศรี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาธิต ประเสริฐศรี 2553: โรคไมโครสปอริเดียในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ปรินญาปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชโล ลิ้มสุวรรณ, Ph.D. 110 หน้า

การศึกษาโรคไมโครสปอริเดียในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในด้านความรุนแรงของการเกิดโรคต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้ง ผลของฤดูกาลต่อการเกิดโรค การใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำก่อนปล่อยลูกกุ้งเพื่อป้องกันการเกิดโรค ศึกษาลักษณะรูปร่างของสปอร์ของปรสิตไมโครสปอริเดียจากตัวอย่างสดและด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน รวมทั้งพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่เป็นโรคและมีการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียในห้องปฏิบัติการด้วยการศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียบ่อเลี้ยงขนาดพื้นที่บ่อละ 5 ไร่ (8,000 ตารางเมตร) จำนวน 3 บ่อ ปล่อยลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาเว้า 10 (พี 10) ในอัตราความหนาแน่น 125 ตัวต่อตารางเมตร ความเค็มของน้ำระหว่างการเลี้ยง 30-35 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) เริ่มสังเกตเห็นกุ้งที่เข้ามากินอาหารในบ่อติดเชื้อไมโครสปอริเดียหลังจาก 20-25 วัน การติดเชื้อจะสูงที่สุดในวันที่ 60 ของการเลี้ยงทุกบ่อระหว่าง 25-28 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจำนวนกุ้งที่ติดเชื้อจะลดลงและเหลือเพียง 2-3 เปอร์เซ็นต์ในวันที่จับกุ้งอัตราการรอดตายของกุ้งระหว่าง 69.5-71.6 เปอร์เซ็นต์ กุ้งที่ติดเชื้อทั้งในตับและตับอ่อนและในกล้ามเนื้อจะมีน้ำหนักน้อยกว่ากุ้งที่ติดเชื้อเพียงกล้ามเนื้ออย่างเดียวและกุ้งที่ไม่มีการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2551 มีปริมาณกุ้งที่ติดเชื้อสูงสุด 27 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงระหว่างเดือนพฤษภาคม 2551 ถึงสิงหาคม 2551 ที่มีการติดเชื้อสูงสุดเพียง 16 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น อาจเกิดจากเป็นช่วงที่อุณหภูมิต่ำและได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งพัดพาเอาสารอินทรีย์และสปอร์ของปรสิตนี้เข้ามาบริเวณที่เลี้ยงกุ้ง การใช้คลอรีน (ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์) ในอัตรา 18 มิลลิกรัมต่อลิตร (พีพีเอ็ม) ในการเตรียมน้ำก่อนปล่อยลูกกุ้งในบ่อขนาด 4 ไร่ (6,400 ตารางเมตร) จำนวน 5 บ่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 5 บ่อที่ไม่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำก่อนปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่น 80 ตัวต่อตารางเมตร ความเค็มของน้ำ 25-30 พีพีที ระหว่างการเลี้ยงในบ่อทดลองมีกุ้งติดเชื้อเฉลี่ยเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อเฉลี่ยถึง 25 เปอร์เซ็นต์ จากการนำกุ้งที่เป็นโรคที่มีสีขุ่นขาวคล้ายนมได้ส่วนของเปลือกตามบริเวณต่างๆ ของลำตัวมาศึกษาลักษณะของสปอร์สดด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า สปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์อยู่ใน sporophorous vesicle พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจะเห็นสปอร์แทรกอยู่ในส่วนของตับและตับอ่อนกระเพาะอาหาร ต่อมมน้ำเหลืองบริเวณหัวใจ เหงือก ต่อมเมือก เซลล์ประสาท เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด แต่ไม่พบ encapsulation หรือ xenoma formation การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านสปอร์ที่เจริญเต็มที่ให้เห็น polar filament วนเป็นเกลียว 8 เกลียวอยู่ด้านท้ายของสปอร์ ซึ่งลักษณะนี้ทำให้จำแนกเป็นชนิด *Thelohania penaeii* ซึ่งยืนยันจากการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ที่ให้ผลบวกด้วย ส่วนการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียในห้องปฏิบัติการโดยให้ลูกกุ้งระยะพี 10 จำนวน 100 ตัว กินกุ้งที่ติดเชื้อและกินสิ่งขับถ่ายของปลาชนิดที่พบในบ่อพักน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่มีกุ้งเป็นโรคนี้นี้และได้กินกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียเป็นระยะเวลา 2 เดือนไม่พบการติดเชื้อในกุ้งทดลองแสดงว่าปลาไม่จำเป็นเจ้าบ้านระยะต้นของไมโครสปอริเดีย

ผลการศึกษาดังกล่าวได้ว่าคุณภาพผลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียและโรคนี้นี้มีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวในบ่อเลี้ยง การป้องกันโรคไมโครสปอริเดียในพื้นที่ๆ มีการระบาดของโรคนี้นี้ควรจะใช้คลอรีนในอัตราความเข้มข้น 18 พีพีเอ็ม สำหรับการเตรียมน้ำก่อนการปล่อยกุ้ง

ลายมือชื่อนิติสด

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Satit Prasertsri 2010: Microsporidiosis in Cultured Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Doctor of Philosophy (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 110 pages.

Microsporidiosis in cultured Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) which emphasis on severity of this disease on growth, survival rate and seasonal variation on the prevalence of infection was studied. Application of calcium hypochlorite for water preparation prior to stocking postlarvae (PL) as the prevention measure was also studied. Morphology of microsporidia and histological changes of infected shrimp were examined under light microscopy, scanning electron microscopy (SEM), and transmission electron microscopy (TEM). Experimental transmission of microsporidia was carried out in laboratory condition to determine whether fishes can become intermediate host of this parasite. Microsporidian infection was investigated in three earthen ponds (8000 m²) with the stocking density of PL10 at 125 PL/ m² and the salinity was 30-35 parts per thousand (ppt). Shrimp were first observed to be infected with microsporidian parasites between 20-25 days after stocking. The highest prevalence of infection between 25-28 % was found at day 60 in all growthout ponds. Subsequently, the prevalence of infection decreased until the shrimp were harvested at day 120 when only 3-5 % of shrimp remained microsporidian infection from the three rearing ponds. Shrimp infected in both hepatopancreas and abdominal muscle had the lowest weight which was significantly different ($P < 0.05$) from shrimp infected in only abdominal muscle and the uninfected shrimp. The culture period between October 2007 to February 2008 had the highest prevalence of microsporidian infection at 27 % which higher than the culture period between October 2007 to February 2008 with the highest infection was only 16 %. The percentage infection probably due to lower temperature during the winter and environmental changes from the northeast monsoon season which affected intermediated host of this microsporidian. The efficacy of calcium hypochlorite (60 % active ingredient) at 18 mg/l for water treatment before stocking PL at the density of 80 PL/ m² into five growthout ponds (6,400 m²) was compared to five control ponds without calcium hypochlorite treatment. Results showed that the average highest percentage of microsporidian infection in the treatment pond was 5 % significantly lower than 25 % in the control ponds ($P < 0.05$). Examination of fresh smear spores with light microscopy revealed each sporophorous vesicle containing eight spores which had an ellipsoidal or oval shape. Histopathological changes in diseased shrimp revealed that white masses of microsporidian parasites had partially replaced the hepatopancreas, stomach, lymphoid organs, heart, gills, antennal gland, hemopoietic tissue and abdominal striated muscle but there were no apparent host encapsulation or xenoma formation. The transmission electron microscopy revealed that this microsporidian spores had the polar filament and eight coils at the end of spore. Description of this characteristic indicate that this microsporidia belonging to *Thelohania penaei* and confirmed by PCR method which gave positive result. Microsporidiosis could not be transmitted experimentally to PL10 after fed with microsporidian infected shrimp or feces from fishes (species found in reservoir of infected-farm) that fed infected shrimp for two months. This study indicated that fish may not be the first intermediate host of this microsporidian parasite. In conclusion, this study revealed that the seasonal variation affected the prevalence of microsporidiosis. This disease had negative effect on growth and survival rate of shrimp. Calcium hypochlorite at the concentration of 18 mg/l which is commonly used for water treatment and eradication of wild crustaceans before stocking PL significantly reduced the prevalence of microsporidian infection.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก
รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลิมสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร. นิตติ ชูเชิด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ในการปฏิบัติ
งานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้
ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ และคุณเพ็ญพรรณ นवलบุญมา
ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย
ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบพระคุณ ดร. เต็มดวง สมศิริ ผู้อำนวยการสถาบันสุขภาพ
สัตว์น้ำจืด กรมประมง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ขอขอบพระคุณ
ศาสตราจารย์ ดร. ทิมโมที วิลเลียม พีเกล หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง
(Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และรองศาสตราจารย์ ดร. ชีรศักดิ์
พัชรวิภาส คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำในการศึกษา
ครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน สำหรับความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ในการศึกษาวิจัย
ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือสนับสนุนด้วยดี

สาธิต ประเสริฐศรี

มีนาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลและวิจารณ์ผล	29
สรุปผล	84
ข้อเสนอแนะ	86
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	87
ภาคผนวก	95
ภาคผนวก ก ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ ส่องผ่าน (TEM)	96
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (SEM)	100
ภาคผนวก ค ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ	103
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	110

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงชนิดของปรสิต <i>Thelohania</i> ที่พบการติดเชื้อในกุ้งและครัสตาเซียน	12
2 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียมของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยง	31
3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในบ่อเลี้ยงที่ 1 ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมแตกต่างกัน	63
4 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในบ่อเลี้ยงที่ 2 ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมแตกต่างกัน	63
5 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในบ่อเลี้ยงที่ 3 ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมแตกต่างกัน	64
6 ผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมแตกต่างกัน	64
7 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียมของกุ้งขาวแวนนาไมใน 2 รอบการเลี้ยง	75
8 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียมในกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในบ่อที่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำและบ่อที่ไม่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำก่อนการเลี้ยง	82
9 ผลการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในบ่อที่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำและบ่อที่ไม่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำก่อนการเลี้ยง	83

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะสปอร์ของปรสิตในกลุ่มไมโครสปอริเดีย	10
2 บ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในอำเภอทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ที่พบการติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดีย	22
3 บ่อพักน้ำขนาด 3 ไร่ ของฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่พบการติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดีย	23
4 การนำเนื้อเยื่อสีขาวจากกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมาศึกษาลักษณะของสปอร์สด	23
5 การนำเนื้อเยื่อสีขาวจากกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมาย้อมด้วยสี Giemsa เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์	24
6 กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมีลักษณะเป็นก้อนสีขาวบริเวณหัวและลำตัวซึ่งจะพบในขอในช่วง 20 วันแรกของการเลี้ยง	24
7 การตรวจสอบความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียโดยการส่องกล้องด้วยแห เมื่ออายุกุ้ง 45 วันและทำการส่องทุก 15 วันจนกระทั่งจับกุ้ง	25
8 กุ้งติดเชื้อไมโครสปอริเดียแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กุ้งที่ติดเชื้อทั้งในตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัว (ตัวล่าง) กลุ่มที่ 2 กุ้งที่มีการติดเชื้อเฉพาะบริเวณกล้ามเนื้อลำตัว (ตัวกลาง) และกลุ่มที่ 3 กุ้งปกติ (ตัวบน)	25
9 ปลาหมอเทศ (<i>Oreochromis mossambicus</i>) ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย	26
10 ปลากะพงขาว (<i>Lates calcarifer</i>) นำมาจากโรงเพาะของเอกชนเพื่อนำมาทดลองการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไม	26
11 ปลาดุก (<i>Scatophagus argus</i>) ที่จับจากธรรมชาติเพื่อนำมาทดลองการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไม	27
12 ตู้กระจกขนาด 100 ลิตรที่ใช้ในการทดลองการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไม	27
13 การทดลองการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียในลูกกุ้งที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือนในคอกที่อยู่ในบ่อพักน้ำ	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
14	28
15	31
16	32
17	32
18	33
19	33
20	34
21	34
22	38
23	39
24	39
25	40
26	40
27	41
28	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
29 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด sporophorous vesicle (S) ที่มีขนาดต่างๆ กัน ขนาดเล็กเป็นระยะ sporont (สรชี้) อยู่ภายใน (bar=5 μ M)	43
30 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าภายใน sporophorous vesicle (S) ประกอบด้วยสปอร์เดี่ยวๆ (สรชี้) อยู่ภายใน (bar= 5 μ M)	43
31 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดบริเวณที่ปรสิต <i>T. penaei</i> (สรชี้) แทรกอยู่ในเซลล์ตับและตับอ่อน (H) (bar=10 μ M)	44
32 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงบริเวณกล้ามเนื้อ (M) ที่มีปรสิต <i>T. penaei</i> (สรชี้) แทรก (bar=10 μ M)	44
33 ลำไส้กุ้งขาวที่ติดเชื้อถูกล้อมด้วยเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นของปรสิตไมโครสปอริเดียม	45
34 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลำไส้ (สรชี้) ที่มีปรสิต <i>T. penaei</i> (M) จำนวนมากห่อหุ้ม (bar=500 μ M)	45
35 semithin section ของตับและตับอ่อนของกุ้งขาว (H) ที่แทรกด้วยปรสิตไมโครสปอริเดียม (M) แทรกเป็นจำนวนมาก (bar=50 μ M)	46
36 semithin section ของกล้ามเนื้อของกุ้งขาว (Ms) ที่แทรกด้วยปรสิตไมโครสปอริเดียม (M) (bar=20 μ M)	46
37 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงระยะต่างๆ ของสปอร์ <i>T. penaei</i> ในกุ้งขาวแวนนาไม ระยะสปอร์ที่พัฒนาสมบูรณ์แล้ว (Mature spore) (สรชี้) และสปอร์ที่อยู่ในระยะแบ่งตัว (developmental stage) (D)	47
38 ปรสิต <i>T. penaei</i> ระยะ merogony ที่มีนิวเคลียส (N) และนิวคลีโอลัส (Nu) ที่มีด้านใดด้านหนึ่งติดกันแบบ diplokaryotic และสปอร์ในระยะพัฒนาสมบูรณ์ (S)	47
39 การแบ่งตัวของปรสิต <i>T. penaei</i> ระยะ binary fussion ที่มีนิวเคลียส (N) อันเดียวชัดเจน และในระยะนี้มีการเกิด granular ขนาดเล็ก (G)	48
40 การแบ่งตัวระยะสุดท้ายของปรสิต <i>T. penaei</i> เกิด sporont ที่แบ่งตัวจนเป็นสปอร์เดี่ยว 8 สปอร์ (ภาพตัดผ่านได้เพียง 7 สปอร์) แต่ละสปอร์ล้อมรอบด้วย granular ขนาดเล็ก (D) มีนิวเคลียส (N) และ posterior vacuole (P) และ postosome (สรชี้)	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
41 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงให้เห็น exospore (E) และ endospore (สรชี้) ซึ่ง exospore มีลักษณะแถบมืดสลับกับแถบสว่าง	49
42 แสดงส่วนปลายสุดของสปอร์มี anchoring disc (AD) มีลักษณะคล้ายดอกเห็ดและมีท่อเชื่อมต่อด้านล่าง (manubroid) (M)	49
43 ภาพตัดตามยาวของสปอร์แสดงให้เห็นผนังเซลล์สองชั้นอย่างชัดเจน endospore (EN) และ exospore (EX) และรวมทั้ง polar filament (PF)	50
44 ภาพตัดตามยาวของสปอร์แสดงให้เห็น anchoring disc (AD) มีลักษณะคล้ายดอกเห็ดและมีท่อเชื่อมต่อด้านล่าง (manubroid) (M) และมี polar filament (PF) รวมทั้งผนังเซลล์สองชั้นอย่างชัดเจน endospore (EN) และ exospore (EX)	50
45 กุ้งขาวแวนนาไมอายุ 30 วัน ที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียม มีเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นของปรสิตไมโครสปอริเดียมในส่วนต่างๆ ของลำตัว (สรชี้)	52
46 ลักษณะภายในลำตัวของกุ้งขาวแวนนาไมอายุ 30 วัน ที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมอย่างรุนแรงมีเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย (สรชี้)	53
47 กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมเฉพาะบางส่วนของกล้ามเนื้อลำตัวเท่านั้น (สรชี้)	53
48 ลักษณะภายในของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมจะมีสีขาวขุ่นแทนที่ส่วนของกล้ามเนื้อบางส่วน (สรชี้)	54
49 ดับและดับอ่อน (H) ของกุ้งขาวแวนนาไมถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดียม (M) จำนวนมาก (H&E, bar=500 μ M)	54
50 ปรสิตไมโครสปอริเดียม (M) แทรกในดับและดับอ่อน ทำให้เซลล์บุท่อดับและดับอ่อนเสื่อมสภาพ (สรชี้) (H&E, bar = 200 μ M)	55
51 เซลล์บุท่อดับและดับอ่อนของกุ้งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมมีรูปร่างผิดปกติ (สรชี้) (H&E, bar=200 μ M)	55
52 ลักษณะของเซลล์บุท่อดับและดับอ่อนของกุ้งขาวปกติที่มี R- cell สำหรับเก็บสะสมอาหารจำนวนมาก (สรชี้) (H&E, bar = 200 μ M)	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
53 ภาวะอาหาร (S) ของกึ่งที่ติดเชื่อจะถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดียจำนวนมาก (M) (H&E, bar=500 μ M)	56
54 ต่อมน้ำเหลือง (L) ของกึ่งที่ติดเชื่อไมโครสปอริเดียจะถูกแทนที่ด้วยปรสิตจำนวนมาก (M) (H&E, bar=200 μ M)	57
55 หัวใจ (Ht) ของกึ่งที่ติดเชื่อจะถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดีย (M) (H&E, bar=500 μ M)	57
56 เหงือกของกึ่งที่ติดเชื่อจะถูกแทรกด้วยไมโครสปอริเดีย (สรชี้) (Giemsa, bar=50 μ M)	58
57 กล้ามเนื้อ (MS) บริเวณลำตัวบางส่วนของกึ่งที่ติดเชื่อถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดีย (M) (H&E, bar=200 μ M)	58
58 กล้ามเนื้อบริเวณลำตัว (ติดสีชมพู) บางส่วนของกึ่งที่ติดเชื่อถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดีย (ติดสีน้ำเงิน) (Giemsa, bar=200 μ M)	59
59 ต่อมเมือก (T) บางส่วนของกึ่งที่ติดเชื่อจะมีปรสิตไมโครสปอริเดียแทรก (M) (H&E, bar=200 μ M)	59
60 พยาธิสภาพของเซลล์ประสาท (N) ของกึ่งที่ติดเชื่อจะพบปรสิตไมโครสปอริเดียแทรกอยู่จำนวนมาก (M) (H&E, bar=200 μ M)	60
61 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (He) ของกึ่งที่ติดเชื่อจะพบปรสิตไมโครสปอริเดียแทรกอยู่จำนวนมาก (M) (H&E, bar=200 μ M)	60
62 ลักษณะ granuloma (สรชี้) ที่พบในตับและตับอ่อน (สรชี้) ของกึ่งที่ติดเชื่อไมโครสปอริเดีย (M) (H&E, bar=100 μ M)	61
62 บริเวณกล้ามเนื้อลำตัวของกึ่งที่ติดเชื่อไมโครสปอริเดียบางส่วนมีการอักเสบ (สรชี้) สังเกตจากมีเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมาก (H&E, bar=100 μ M)	61
64 กึ่งขาวเวนนานาไมที่ติดเชื่อทั้งในบริเวณตับและตับอ่อนและบริเวณกล้ามเนื้อลำตัว (A) มีขนาดเล็กกว่ากึ่งที่ติดเชื่อเฉพาะในส่วนของกล้ามเนื้อลำตัวอย่างเดี่ยว (B) และกึ่งปกติอย่างชัดเจน (C)	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
65	
กึ่งที่มีการติดเชื้อทั้งในบริเวณตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัว มีลำตัวพอมและเปลี่ยนสีมากกว่ากึ่งปกติ (ตัวบน) อย่างชัดเจน	65
66	
กึ่งที่ติดเชื้อบริเวณตับและตับอ่อนมีเนื้อเยื่อสีขาวแทรกอยู่ในบริเวณตับจำนวนมากจนเหลือส่วนของตับและตับอ่อนที่เป็นปกติ (ศรีษะ) น้อยมาก	66
67	
กึ่งที่ติดเชื้อในตับและตับอ่อนมีปรสิตไมโครสปอริเดีย (ศรีษะ) แทรกอยู่จำนวนมาก (H&E, bar=200 μ M)	66
68	
กึ่งขาวแวนนาไมที่ผ่านการทดลองการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 2 เดือน แต่ไม่สามารถทำให้มีการติดเชื้อได้	69
69	
ผลการศึกษาคัดเชื้อไมโครสปอริเดียด้วยวิธีพีซีอาร์	70
70	
สปอร์เดี่ยวๆ (ศรีษะ) ของปรสิตไมโครสปอริเดียที่อยู่ในสิ่งขับถ่ายของปลาที่กินกึ่งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (bar=20 μ M)	71
71	
สปอร์เดี่ยวๆ (ศรีษะ) ของปรสิตไมโครสปอริเดียที่อยู่ในสิ่งขับถ่ายของกึ่งที่กินสิ่งขับถ่ายของปลาที่กินกึ่งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (bar=50 μ M)	71
72	
การตรวจสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียของกึ่งขาวที่เลี้ยงในคอกที่อยู่ในบ่อพักน้ำเมื่อระยะเวลาการเลี้ยง 30 วัน	72
73	
แพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโคพีพอดที่พบในบ่อเลี้ยงและบริเวณชายฝั่งทะเลที่นำน้ำมาใช้เลี้ยงกึ่งขาวที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย	72
74	
ลักษณะของเนื้อเยื่อของแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโคพีพอดที่ไม่พบปรสิตไมโครสปอริเดีย (H&E, bar= 50 μ M)	73
75	
ลักษณะของเนื้อเยื่อแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโคพีพอดไม่พบปรสิตไมโครสปอริเดียในส่วนต่างๆ (H&E, bar= 50 μ M)	73
76	
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียของกึ่งขาวแวนนาไมในสองรอบการเลี้ยง	76
77	
ท่อสูบน้ำเข้าในบ่อเลี้ยงของฟาร์มเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมติดตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลที่ได้รับอิทธิพลของกระแสน้ำและคลื่นโดยตรง	76
78	
บ่อเลี้ยงกึ่งขาวแบบดั้งเดิมที่ใช้การเปิดประตูน้ำเพื่อรับลูกกึ่งจากธรรมชาติเข้าสู่บ่อเลี้ยง	77

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
79 ลักษณะของกึ่งแซบวัยติดเชื้อไมโครสปอริเดียซึ่งเลี้ยงแบบดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดสมุทรสาคร	77
80 ลักษณะของกึ่งแซบวัยติดเชื้อไมโครสปอริเดียซึ่งเลี้ยงแบบดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการ	78
81 เมื่อนำกึ่งแซบวัยที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมาผ่าตามยาวพบว่าก้อนสีขาวขุ่นของปรสิตแทรกอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อบนลำตัวกึ่งและบริเวณส่วนหัวกึ่งด้วย	78
82 สปอร์ของไมโครสปอริเดียมีรูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์ อยู่ในถุงหุ้มสปอร์ (bar= 20 μ M)	79
83 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อน(H) และต่อมน้ำเหลือง (L) ของกึ่งแซบวัยที่ติดเชื้อจะพบปรสิตไมโครสปอริเดียแทรกอยู่จำนวนมาก (M) (H&E, bar=500 μ M)	79
84 กึ่งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียเริ่มพบในขอมเมื่อกึ่งอายุ 30 วัน	81
85 กึ่งที่ติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียพบเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นบนส่วนต่างๆ ของลำตัว	81

โรคไมโครสปอริเดียในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Microsporidiosis in Cultured Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)

คำนำ

การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่นั้นปี พ.ศ. 2545 เมื่อกรมประมงอนุญาตให้มีการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อเข้ามาทดลองเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกับเกษตรกรส่วนใหญ่ที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กำลังประสบปัญหากุ้งโตช้า ทำให้ผลผลิตลดลง ในขณะที่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ผลดี เกษตรกรส่วนใหญ่จึงเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมากขึ้น ทำให้ในปี พ.ศ. 2549 ผลผลิตจากการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีจำนวนมากถึงประมาณ 500,000 ตัน ส่วนกุ้งกุลาดำมีผลผลิตประมาณ 20,000 ตันเท่านั้น ซึ่งแนวโน้มการเลี้ยงกุ้งขาวยังคงได้รับความนิยมต่อไปแม้ว่าจะเกิดปัญหาโรคระบาดมากในช่วง ปี พ.ศ. 2550-2552 นอกจากนั้นบางช่วงเวลากการเลี้ยงได้รับความเสียหายจากกุ้งป่วยเป็นโรคที่สำคัญได้แก่ โรคไวรัสดวงขาว (white spot syndrome virus) โรคทอรา (Taura syndrome virus) และโรคไวรัสหัวเหลือง (yellow-head virus) แต่การเลี้ยงกุ้งชนิดนี้ก็ยังคงได้รับความนิยมจากเกษตรกร เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมได้ผ่านการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลานานทำให้เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ขนาดใกล้เคียงกัน และให้ผลผลิตต่อไร่สูง (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

แต่เมื่อประมาณกลางปี พ.ศ. 2550 มีรายงานการเกิดโรคไมโครสปอริเดีย (microsporidia) ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย ซึ่งกุ้งที่ติดเชื้อมีลักษณะเป็นก้อนเนื้อสีขาวขุ่นเกิดขึ้นที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนตัวกุ้ง แม้ว่าโรคชนิดนี้ทำความเสียหายต่อผลผลิตได้ระดับหนึ่งเท่านั้น ไม่ทำให้กุ้งในบ่อเลี้ยงตายอย่างรุนแรง แต่กุ้งที่ป่วยมีลักษณะไม่เป็นที่ต้องการของผู้ซื้อ และโรคที่เกิดจากไมโครสปอริเดียในกุ้งทะเลเรียกตามลักษณะอาการที่สังเกตได้ง่ายของกุ้งที่เป็นโรคคือ cotton shrimp หรือ milk shrimp ซึ่งส่วนใหญ่มีรายงานมาจากทวีปอเมริกา (Iversen and Manning, 1959; Baxter *et al.*, 1970; Feigenbaum, 1975) ส่วนในประเทศไทยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งมักจะเรียกว่า โรคหลังขาว (white back shrimp) พบได้ทั่วไปในกุ้งแชบ๊วย (*P. merguensis*) ที่เลี้ยงในบ่อเลี้ยงแบบดั้งเดิม บ่อพักน้ำและในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำบริเวณที่พบการเกิดโรคหลังขาวในกุ้งแชบ๊วย (ชลอ ,

2534; Flegel *et al.*, 1992) พื้นที่เลี้ยงกุ้งที่มีรายงานการพบโรคหลังขาวมาก ได้แก่ จังหวัด นครศรีธรรมราช และแหล่งเลี้ยงกุ้งตามแนวชายฝั่งทะเลที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มปกติ โดยเฉพาะใน บริเวณอ่าวไทย ปรสิต์ไมโครสปอริเดียมที่มีรายงานพบในกุ้งแชบ๊วยและกุ้งกุลาดำในประเทศไทยอยู่ในสกุล *Thelohania* (*Agmasoma*) (ชลอ, 2534) ซึ่งเป็นชนิด *Agmasoma peanei* (Hazard and Oldacre, 1975; Flegel *et al.*, 1992) ไมโครสปอริเดียมสกุลนี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีรายงานการพบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำจากหลายประเทศ ได้แก่ มาเลเซีย (Anderson *et al.*, 1989) ส่วนในประเทศออสเตรเลียส่วนใหญ่พบในกุ้งจากธรรมชาติหลายชนิด แต่มีบางฟาร์มต้องหยุดการเลี้ยง เนื่องจากโรคที่เกิดจากไมโครสปอริเดียม (Bergin, 1986; Owens and Glazebrook, 1988)

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการเกิดโรคไมโครสปอริเดียมในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ต้องการทราบกระบวนการเกิดโรคไมโครสปอริเดียมทั้ง ความรุนแรงของการเกิดโรค การติดเชื้อและการแพร่กระจายของการเกิดโรคนี้ในระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อเป็นข้อมูลที่จะนำไปหาแนวทางป้องกันและลดความเสียหายจากโรคชนิดนี้ในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะรูปร่างของปรสิตไมโครสปอริเดียที่ก่อให้เกิดโรคในกึ่งขาวแวนนาไม
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ (histopathology) ของกึ่งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย
3. ศึกษาความรุนแรงของการเกิดโรคจากปรสิตไมโครสปอริเดียและผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและผลผลิตในฟาร์มเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไม
4. ศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกึ่งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ
5. ศึกษาผลของฤดูกาลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกึ่งขาวแวนนาไม
6. ศึกษาแนวทางการป้องกันการติดเชื้อไมโครสปอริเดียโดยใช้คลอรีนเตรียมน้ำก่อนปล่อยลูกกึ่งขาวแวนนาไม

การตรวจเอกสาร

ชีววิทยาบางประการของกุ้งขาวแวนนาไม

Holthuis (1980); Farfante and Kensley (1997) ได้จำแนกอันดับของกุ้งขาวแวนนาไมไว้ดังนี้

Phylum Arthropoda

Superclass Crustacea

Class Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Dendrobranchiata

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

Litopenaeus vannamei Boone, 1931

ชื่อสามัญที่ FAO รับรองเป็นภาษาต่างๆ จะแตกต่างกันออกไปในแต่ละประเทศ เช่น ภาษาอังกฤษเรียก white leg shrimp หรือ Pacific white shrimp (Wyban *et al.*, 1995) ภาษาฝรั่งเศสเรียก coevette pattes blanches และในสหรัฐอเมริกาเรียก west coast white shrimp (Dore and Frimodt, 1987) ส่วนประเทศไทยในช่วงแรกที่มีการนำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงมีชื่อเรียกทั่วไปว่า กุ้งขาวแปซิฟิก (ภิญโญ, 2545) และอีกหลายชื่อ เช่น กุ้งขาว กุ้งขาวแวนนาไม (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) โดยกุ้งขาวแวนนาไมมีลักษณะภายนอกดังนี้ คือลำตัวเป็นสีขาวหรืออาจมีลักษณะลำตัวออกสีฟ้า เนื่องจากมีโครมาโตพอร์(chromatophore) สีฟ้า ซึ่งจะรวมกันจนเกือบถึงบริเวณหางใกล้ส่วนของ telson และ uropod (Eldred and Hutton, 1960) ลักษณะเฉพาะที่สามารถสังเกตได้เด่นชัดคือ บริเวณพินกรี (หนาม) ด้านบนจะหยักและถี่ ปลายกริดตรง โดยที่มีพินกรีด้านล่าง 2 อัน และด้านบน 8 อัน ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก ขามีสีขาว มีขนาด 2 คู่สั้นยาว กุ้งขาวแวนนาไมมีขนาดโตเต็มที่มีความยาวทั้งหมด (total length) 230 มิลลิเมตร (9 นิ้ว) (Holthuis, 1980) กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งพันธุ์พื้นเมืองของชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกบริเวณอเมริกาใต้และกลาง (Rosenberry, 1997) สามารถพบได้ในทางตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกไปจนกระทั่งถึงทางตอนเหนือของประเทศเปรูที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 องศาเซลเซียสขึ้นไป และพบที่ระดับความลึก 0- 72 เมตร ซึ่งพื้นที่ท้องทะเลเป็นโคลน (Holthuis, 1980) ได้แก่ รัฐบาลจาเคลิฟอว์เนียของประเทศเม็กซิโก

กัวเตมาลา เอลซัลวาดอร์ ฮอนดูรัส นิการากัว คอสตาริกา ปานามา โคลอมเบีย เอกวาดอร์ (Tseng, 1987) ซึ่งกึ่งขาวแวนนาไมเป็นกึ่งที่มีการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมได้ดี โดยสามารถอาศัยอยู่ในช่วงความเค็มกว้างตั้งแต่ 0-50 ส่วนในพันส่วน(พีพีที) (Mair, 1980) และสามารถปรับตัวอยู่ในอุณหภูมิตั้งแต่ 24-32 องศาเซลเซียส แต่ที่มีความเหมาะสมในการเลี้ยงคือ 28-30 องศาเซลเซียส ลักษณะอุปนิสัยของกึ่งขาวแวนนาไมจะเป็นแบบ non-grooved species groups ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการเคลื่อนตัวได้เร็ว ว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลา ไม่ชอบหมกตัว (Boddeke, 1983) จึงต้องการปริมาณออกซิเจนค่อนข้างสูง และมีอุปนิสัยก้าวร้าว ทำร้ายกึ่งตัวอื่น กึ่งขาวสามารถกินได้ทั้งพืชและสัตว์ และซากของสิ่งมีชีวิตที่อยู่บริเวณกลางน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถกินได้ทั้งสิ่งมีชีวิตที่อยู่บริเวณผิวน้ำดินและซากของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นอีกด้วย (Wassenberg and Hill, 1987)

รูปแบบการเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไม

เนื่องจากกึ่งขาวแวนนาไมเป็นกึ่งที่เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นระยะเวลานาน จึงเป็นที่นิยมเลี้ยงมากในประเทศแถบซีกโลกตะวันตก ซึ่งประเทศที่มีการเลี้ยงได้แก่ เอกวาดอร์ เม็กซิโก บราซิล โคลอมเบีย เปรู เวเนซุเอลา เบลิจ คอสตาริกา เอลซัลวาดอร์ กัวเตมาลา ฮอนดูรัส ปานามา สหรัฐอเมริกา บาฮามาส สาธารณรัฐโดมินิกัน และเปอร์โตริโก (Lester, 1992) สำหรับประเทศในแถบทวีปเอเชียในระยะแรกได้นำมาทดลองเลี้ยงในประเทศฟิลิปปินส์เมื่อปี ค.ศ. 1978-1979 และในประเทศจีนเมื่อปี 1988 หลังจากนั้นก็ได้เริ่มมีการเลี้ยงกันมากขึ้นอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในประเทศจีนมีการเลี้ยงมากที่สุด ซึ่งในปัจจุบันในแถบซีกโลกตะวันออกที่มีการเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมได้แก่ จีน ไต้หวัน เวียดนาม ไทย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และอินเดีย (Funge-Smith and Bringgs, 2003) สำหรับวิธีการเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมมีทั้งแบบดั้งเดิม (extensive) คือ ปล่อยลูกกึ่งจำนวนน้อย กึ่งพัฒนา (semi-intensive) มีการปล่อยลูกกึ่งมากขึ้น และพัฒนา (intensive) ที่มีการปล่อยลูกกึ่งอย่างหนาแน่น ในบางแห่งอาจมีการเลี้ยงในรูปแบบพัฒนาหนาแน่นมาก (super-intensive) ซึ่งการเลี้ยงของแต่ละรูปแบบจะทำการเลี้ยง 2-3 รอบต่อปี (Lee and Wickins, 1992) โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 67-164 วัน (Aquacop, 1984) และลูกกึ่งที่ปล่อยมีขนาด 0.6-2.0 เซนติเมตร (Wyban *et al.*, 1987) นอกจากนี้ยังมีการนำกึ่งขาวแวนนาไมในระยะโพสลาร์วามาจากโรงเพาะฟักที่น้ำมีความเค็มปกติมาเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มต่ำ ซึ่งประสบความสำเร็จมากในประเทศสหรัฐอเมริกา (McGraw *et al.*, 2002) และสำหรับการเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 หลังจากกรมประมงอนุญาตให้มีการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กึ่งขาวแวนนาไมที่ปลอดเชื้อเข้ามาทดลองเลี้ยง โดยการเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมสามารถ

แบ่งเป็น 2 แบบ ตามความเค็มของน้ำ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) แบบแรกเป็นการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม่ด้วยน้ำความเค็มต่ำโดยเฉพาะในพื้นที่ภาคกลาง ซึ่งการเลี้ยงกุ้งวิธีนี้ น้ำที่ใช้เลี้ยงจะมีความเค็มต่ำมากจนเกือบจะเป็นระดับที่ถือว่าเป็นน้ำจืด โดยทั่วไปเกษตรกรจะใช้น้ำเค็มความเข้มข้นสูงจากนาเกลือที่มีความเค็มประมาณ 100-200 พีพีที มาเติมในน้ำจืดเพื่อให้ได้ความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที และมีการกั้นคอกในบ่อเลี้ยงโดยใช้ผ้าพลาสติกพื้นที่ประมาณ 15 ตารางเมตร ความลึกประมาณ 80 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำจากนาเกลือจนได้ความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้นจะใช้ลูกกุ้งขาวระยะโพสลาร์วา 10-12 (พี 10-12) ซึ่งปรับความเค็มจากโรงเพาะฟักมาแล้วโดยปล่อยลูกกุ้งลงในคอกและอนุบาลประมาณ 3-4 วัน ก่อนที่จะเปิดคอกให้ลูกกุ้งกระจายทั่วบ่อ ส่วนอีกวิธีหนึ่งเกษตรกรจะไม่กั้นคอก แต่จะเตรียมน้ำความเค็มประมาณ 3-5 พีพีทีทั้งบ่อแล้วให้ทางโรงเพาะฟักปรับความเค็มของลูกกุ้งให้อยู่ที่ความเค็มต่ำที่สุดซึ่งต้องใกล้เคียงกับน้ำในบ่อเลี้ยงที่จะนำลูกกุ้งมาปล่อย แล้วนำลูกกุ้งมาปล่อยโดยตรงในบ่อ ซึ่งการเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มต่ำ การปล่อยลูกกุ้งในบ่อไม่หนาแน่นมาก (ภิญโญ, 2545) ส่วนรูปแบบที่สองเป็นการเลี้ยงกุ้งด้วยน้ำความเค็มปกติที่มีความเค็มของน้ำมากกว่า 10 พีพีทีขึ้นไป ซึ่งพื้นที่การเลี้ยงส่วนใหญ่จะอยู่ริมชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะทางภาคใต้ การปล่อยลูกกุ้งส่วนใหญ่มีความหนาแน่นสูง คือ มากกว่า 120,000 ตัวต่อไร่ ผลผลิตประมาณ 2 ตันต่อไร่ และมีอัตราการรอดตายประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ การเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มปกติจะได้ผลดีกว่าน้ำเค็มต่ำเนื่องจากการถ่ายน้ำปริมาณที่มากในช่วงท้ายของการเลี้ยง (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ปรสิตกลุ่มสัตว์เซลล์เดียว (Protozoa parasite)

ปรสิต (parasite) หมายถึง ตัวเบียน ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาจมีเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ก็ได้ที่อยู่อาศัยกับสิ่งมีชีวิตอื่นและเป็นฝ่ายได้รับประโยชน์จากการอยู่ร่วมกันนี้ ซึ่งความสัมพันธ์นี้อาจจะทำอันตรายหรือไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเจ้าบ้านก็ได้ (ประไพศิริ, 2546) ส่วนโพรโทซัว (protozoa) เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวขนาดเล็กที่ส่วนใหญ่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งความรู้เกี่ยวกับโพรโทซัวพัฒนาขึ้นมาพร้อมกับพัฒนาการของกล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาโพรโทซัวใน ปี ค.ศ. 1590 ปัจจุบันมีการศึกษาเรื่องราวของโพรโทซัวอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้เกี่ยวข้องกับมนุษย์และสัตว์โดยทำให้เกิดโรคสำคัญหลายชนิด โดยการศึกษาส่วนใหญ่จึงเน้นโพรโทซัวที่เป็นปรสิตเพื่อหาวิธีการป้องกันและกำจัด โดยรูปร่างของโพรโทซัวแตกต่างกันมากในระหว่างชนิดจนยากจะอธิบายเกี่ยวกับโพรโทซัวในลักษณะพื้นฐานทั่วไป รูปร่างของเซลล์อาจเป็นทรงกลม หรือเรียวยาว หรืออาจแบนบาง และอาจไม่แน่นอนมีการ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างอยู่ตลอดเวลา ขนาดของโพรโทซัวแตกต่างกันมากตั้งแต่ขนาดเล็กมาก จนถึงโพรโทซัวที่มีขนาดใหญ่จนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าซึ่งสภาพแวดล้อมบางอย่าง เช่น อาหาร จำนวนประชากรก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อขนาดและรูปร่างโพรโทซัว (บพิช, 2546)

การดำรงชีวิตของโพรโทซัวเป็นได้ทั้งผู้ผลิต (producer) ที่สร้างอาหารเองได้ (autotroph) ผู้บริโภค (consumer) ที่สร้างอาหารเองไม่ได้ (heterotroph) ต้องรับอาหารเข้าสู่ร่างกาย และผู้ย่อยสลาย (decomposer) ซึ่งมีความสามารถในการสลายสารอินทรีย์ไปเป็นสารอนินทรีย์ที่ผู้ผลิตสามารถนำไปใช้ได้ อีก นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็นโพรโทซัวที่ดำรงชีวิตอิสระ (free living) และพวกที่เป็นปรสิตซึ่งนอกจากจะเกาะอยู่กับสัตว์น้ำชนิดต่างๆ แล้วยังพบว่าอาศัยอยู่ในร่างกายของสัตว์บกอีกหลายชนิด (บพิช, 2546)

โพรโทซัวที่ดำรงชีวิตเป็นปรสิตนั้นสันนิษฐานว่าเกิดจากโพรโทซัวที่สามารถดำรงชีวิตได้เองเนื่องจากพบว่าโพรโทซัวที่เป็นปรสิตนั้นมีลักษณะคล้ายกับชนิดที่ไม่ได้เป็นปรสิต เพียงแต่มีรูปร่างหรือออร์แกเนลล์บางอย่างที่แตกต่างไป ซึ่งน่าจะเป็นการแปรสภาพเพื่อให้เหมาะสมกับสภาพการเป็นปรสิต การเริ่มเป็นปรสิตอาจเป็นไปได้โดยบังเอิญจากการพลัดเข้าไปอยู่ในเจ้าบ้าน (host) เช่น ถูกกินปนเข้าไปกับอาหาร หรืออาจเกาะอยู่ภายนอกเพื่อใช้เป็นที่อยู่หรือหาอาหาร ในกรณีที่ถูกกินเข้าไปก็อาจเป็นไปได้ที่เซลล์ไม่ถูกย่อยและสามารถดำรงชีวิตอยู่ในอวัยวะนั้นๆ โดยการปรับตัวทั้งทางด้านสัณฐานและสรีระจนกระทั่งเจ้าบ้านและปรสิตยอมรับซึ่งกันและกัน (compatibility) ถ้ายอมรับซึ่งกันและกันน้อยจะเกิดภาวะการเป็นปรสิตเพียงชั่วคราว เนื่องจากการมีปรสิตเข้าไปอาศัยอยู่จะทำลายระบบอวัยวะทำให้เจ้าบ้านตาย เมื่อเจ้าบ้านตายปรสิตตายตามไปด้วยการยอมรับซึ่งกันและกันต้องใช้เวลาช้านานมาก ทั้งเจ้าบ้านและปรสิตต่างก็ต้องปรับตัวให้เข้ากันเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ลักษณะหรือสมบัติเฉพาะอย่างของเจ้าบ้านกับปรสิตที่ทำให้อยู่ร่วมกันได้นี้จะถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานหลายรุ่น จนกระทั่งตัวปรสิตไม่สามารถออกมาดำรงชีวิตเองได้อย่างเดิม เพราะได้วิวัฒนาการทั้งรูปร่างและสรีระไปหลายชั่วอายุแล้วจำเป็นต้องเป็นปรสิตตลอดไป ในช่วงเวลาหลายล้านปีที่ผ่านมาเจ้าบ้านเองได้มีวิวัฒนาการเพื่อให้ตัวเองอยู่รอดในธรรมชาติ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงในเจ้าบ้าน ปรสิตที่อยู่ด้วยจะต้องปรับตัวเพื่อให้เจ้าบ้านปรับตัวเพื่อให้เจ้าบ้านยอมรับได้อย่างเดิม คือ เพิ่มการยอมรับซึ่งกันและกันให้มากขึ้นจนกระทั่งกลายเป็นว่าปรสิตมีความจำเพาะต่อเจ้าบ้านชนิดนั้นๆ (host specificity) การปรับตัวของโพรโทซัวที่เป็นปรสิตที่เข้าไปอยู่ในเจ้าบ้านมีการปรับตัวหลายด้าน คือ การปรับตัวทางด้านรูปร่างโดยมีลักษณะรูปร่างบางอย่างที่แตกต่างไปจากชนิดที่อยู่เป็นอิสระ ทั้งนี้เพื่อความเหมาะสมกับการอาศัยอยู่ในเจ้า

บ้าน ออร์แกนเนลล์บางอย่างหายไปหรือมีขนาดเล็กลง มีออร์แกนเนลล์บางอย่างเพิ่มขึ้นมา ตัวอย่างเช่น ออร์แกนเนลล์ในการเคลื่อนที่ที่มีขนาดเล็กลงหรือหายไปเนื่องจากไม่มีความจำเป็นที่จะต้องเคลื่อนที่อีกต่อไป การสร้างออร์แกนเนลล์ในการยึดเกาะเพิ่มขึ้นมาเพื่อเกาะกับเนื้อเยื่อของเจ้าบ้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งปรสิตที่อาศัยอยู่ในท่อทางเดินอาหารซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการบีบตัวอยู่อย่างสม่ำเสมอ นอกจากในท่อทางเดินอาหารแล้วยังอาจจะเกาะในส่วนอื่นของเจ้าบ้าน เช่น เหงือก หรือ ผิวลำตัว อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงทางด้านรูปร่างไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญต่อการดำรงชีวิตในปรสิตทุกชนิด (บพิธ, 2546)

วิธีการสืบพันธุ์ของโพรโทซัวที่เป็นปรสิตสามารถใช้ในการจำแนกได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นปรสิตที่มีการสืบพันธุ์เพียงแบบเดียว (monogenic parasite) เป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual) หรือแบบอาศัยเพศ (sexual) แบบใดแบบหนึ่งเท่านั้นในวัฏจักรชีวิต ส่วนกลุ่มที่สองคือ ปรสิตที่มีการสืบพันธุ์ทั้งสองแบบในวัฏจักรชีวิต (heterogenic parasite) เป็นการสืบพันธุ์แบบสลับ (alternation of generation) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสปอโรซัว (บพิธ, 2546) โดยโพรโทซัวหลายชนิดเป็นปรสิตในกิ้ง เช่น โรค protozoa fouling ที่มีสาเหตุจากโพรโทซัวในกลุ่ม ciliate ซึ่งได้แก่ *Zoothamnium* sp., *Epistylis* sp., *Vorticella* sp., *Acophrys* spp., *Legenophrys* sp., *Cothurnia* sp., *Acineta* sp., *Ephelota* sp., *Chrysidella* sp., และ *Bodo*-like flagella เกาะตามส่วนต่างๆ ภายนอกตัวกิ้ง เช่น ผิวตัว ทรายค้ำ และเหงือก ซึ่งมักก่อให้เกิดความรำคาญกับกิ้ง โดยกิ้งมักจะมีอาการและพฤติกรรมปกติก่อนที่จะถึงช่วงที่มีการลอกคราบ ซึ่งหากมีการลอกคราบถ้ามีปริมาณโพรโทซัวเป็นจำนวนมากอาจจะทำให้กิ้งตายได้ เนื่องจากโพรโทซัวจะเข้าไปขัดขวางการแลกเปลี่ยนก๊าซของเหงือกและการลอกคราบ ถ้าอาการรุนแรงพบว่าตามลำตัวและทรายค้ำจะมีลักษณะเหมือนขนเป็นกลุ่มเกาะรอบ (Lightner, 1996) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มโพรโทซัว Gregarines ซึ่งเป็นปรสิตที่พบในทางเดินอาหารของกิ้ง ได้แก่ *Nematopsis* spp., *Cephalolobus* spp., (Lightner, 1993) ทำให้กิ้งระยะวัยรุ่นมีอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการแลกเปลี่ยนเนื้อไม่ดี ส่วนของทางเดินอาหารจะสังเกตเห็นเป็นสีเหลืองหรือสีจางลงกว่าปกติ (Lightner, 1996) นอกจากนี้ยังมีปรสิตกลุ่มสัตว์เซลล์เดียวที่ทำให้เกิดโรคในกิ้งหลายชนิดและในหลายประเทศคือ ปรสิตกลุ่มไมโครสปอริเดีย ซึ่งกิ้งที่ติดเชื้อปรสิตชนิดนี้ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นก้อนเนื้อสีขาวขุ่นในส่วนต่างๆ ของกิ้งและเมื่อนำก้อนเนื้อสีขาวดังกล่าวมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบกลุ่มของปรสิตขนาดเล็กจำนวนมาก

ปรสิตกลุ่มไมโครสปอริเดีย (Microsporidian parasite)

ไมโครสปอริเดียเป็นปรสิตภายในเซลล์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งส่วนใหญ่อยู่ใน Class Arthropoda นอกจากนี้ยังเป็นปรสิตในหนอนตัวแบน (flatworm) หนอนตัวกลม (nematode) หนอนปล้อง (annelid) และหนอนจักร (rotifera) และสัตว์มีกระดูกสันหลังอีกบางชนิด เช่น ปลา สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลื้อยคลาน แต่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม น้อยมาก โดยจะพบสปอร์ (spore) ขนาดเล็กเกิดขึ้นภายในเซลล์ของเจ้าบ้าน ไม่มี polar capsule มีแต่ขด filament พนักสปอร์ เป็นเยื่อ 2 ชั้น ชั้นนอก (exospore) เป็น chitin และชั้นใน (endospore) หนากว่า ด้านหน้ามี polar cap ถุงที่อยู่ถัดลงไปคือ polar sac หรือ polaroplast ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยื่นออกของ filament ไม่มี mitochondria สปอร์รูปทรงกลมหรือทรงกระบอกในขณะที่มีชีวิตจะเห็นบริเวณไฮโคลปลายด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน แต่ละสปอร์มี 1 sporoplasm และ filament ยาวเรียวยื่นออกจากสปอร์ เมื่อสปอร์เข้าสู่ทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน polar filament ยื่นออกมาและ sporoplasm ออกจากสปอร์ เป็น amoebula เข้าสู่เยื่อบุทางเดินอาหารแล้วเข้าสู่กระแสเลือดหรือโพรงลำตัวเข้าสู่เซลล์ เพื่อเติบโตและเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณเป็น plasmodium หลายนิวเคลียส และสามารถเพิ่มจำนวนซ้ำได้อีกในเจ้าบ้านเดิม แต่ละนิวเคลียสเจริญเป็น 1 หรือ sporont จึงมีสปอร์เกิดขึ้นจำนวนมาก (บพิช, 2546) ไมโครสปอริเดียเป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในเซลล์ ไม่มี mitochondria ตลอดวงจรชีวิต เป็นปรสิตของสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด รวมทั้งสามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งที่อยู่ในธรรมชาติและกุ้งที่เลี้ยงในบ่อทั้งในระยะวัยอ่อนและกุ้งตัวเต็มวัย โดยพบว่าปรสิตจะแทรกเข้าไปอยู่ในบริเวณส่วนต่างๆ ของกุ้งและแสดงลักษณะผิดปกติคือเนื้อเยื่อบริเวณที่มีปรสิตแทรกอยู่จะมีสีขาว ทำให้มีการเรียกชื่อโรคนี้ว่า milky shrimp หรือ cotton shrimp ในต่างประเทศ (Iversen and Manning, 1959; Baxter *et al.*, 1970; Feigenbaum, 1975) สำหรับประเทศไทย เกษตรกรเรียกกุ้งที่มีอาการผิดปกตินี้ว่า กุ้งหลังขาว (Flegel, 1992) ซึ่ง Lom and Dykova (1992) ได้จำแนกอันดับของไมโครสปอริเดียที่เป็นปรสิตในกุ้งไว้ ดังนี้

Phylum Microspora Sprague, 1977

Class Microsporea Delphy, 1963

Order Microsporidia Balbiani, 1982

Suborder Pansporoblastina Tuzet, Maurand, Fizez, Michel and Fenwick, 1971

Family Glugeidae Henneguy and Thelohan, 1892

Genus *Pleistophora* Gurley, 1893

Family Thelohaniidae Hardzard and Oldacre, 1975

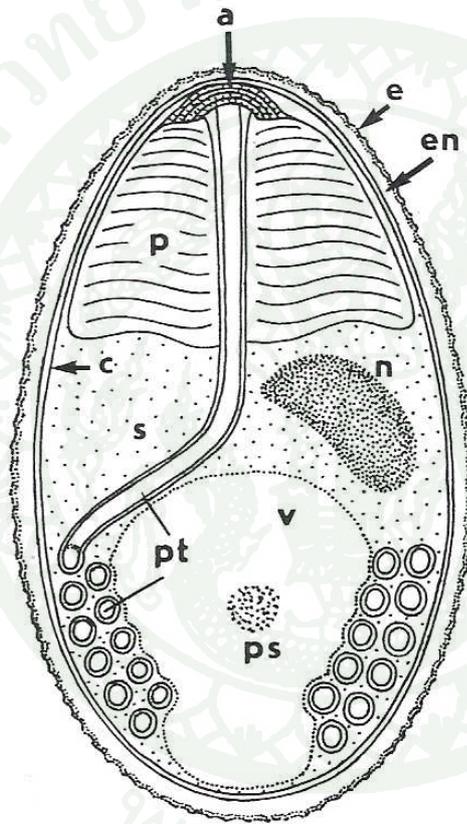
Genus *Thelohania* Henneguy, 1892

Genus *Inodosporus* Sprague, 1992

Suborder Apansporoblastina Tuzet, Maurand, Fizel, Michel and Fenwick, 1971

Family Nosematidae Labbe, 1899

Genus *Nosema* Naegeli, 1857



ภาพที่ 1 ลักษณะสปอร์ของปรสิตในกลุ่มไมโครสปอริเดีย (Lom and Dykova , 1992)

e: exospore, en: endospore, c: cell membrane of the sporoplasm(s); n: nucleus, v: vacuole,

a : anchoring disc or polar sac; p: polaroblast, ps: posterosome, pt: polar tube

การติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งเริ่มมีรายงานตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1971 (Sprague and Couch, 1971) โดยส่วนใหญ่มีรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกา (Iversen and Manning, 1959; Baxter *et al.*, 1970; Feigenbaum, 1975) ส่วนภูมิภาคเอเชียมีรายงานในประเทศมาเลเซีย (Anderson *et al.*, 1989) และประเทศไทยมีรายงานบริเวณภาคใต้ฝั่งตะวันออก (Flegel *et al.*, 1992) ซึ่งการติดเชื้อปรสิต

ไมโครสปอริเดียอาจจะทำให้เกิดการตายสูง โดยเฉพาะในการเลี้ยงกุ้งด้วยความหนาแน่นสูง แต่นอกจากการตายที่เกิดขึ้นแล้ว ลักษณะความผิดปกติภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงทำให้ไม่สามารถนำกุ้งนั้นไปจำหน่ายได้ เนื่องจากไม่เป็นที่ต้องการของผู้ซื้อ (Overstreet, 1973)

ไมโครสปอริเดียที่ก่อให้เกิดโรคนกุ้งมี 4 สกุล คือ *Nosema (Amesoma)*, *Pleistophora (Plistophora)*, *Inodosporus* และ *Thelohania (Agmasoma)* ซึ่งแต่ละสกุลพบการติดเชื้อในกุ้งดังนี้ คือ *Nosema nelsonii* ซึ่ง Sprague (1950) รายงานการพบปรสิตชนิดนี้ในกุ้ง brown shrimp (*P. azteus*) และกุ้ง white shrimp (*P. setiferus*) ในแม่น้ำ Mississippi โดยปรสิต *Nosema nelsonii* จะพบเข้าไปแทรกอยู่ในบริเวณหางของกุ้ง ทำให้เกิดเป็นลักษณะสีขาวในบริเวณหางกุ้ง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของปรสิตชนิดนี้ โดยลักษณะสปอร์ของ *Nosema nelsonii* เป็นสปอร์เดี่ยวๆ ไม่มีถุงหุ้ม แต่ละสปอร์มีความยาว 25 ไมโครเมตร และความกว้าง 1.5 ไมโครเมตร มีเส้นตรงยาว 23 ไมโครเมตร ปรสิตไมโครสปอริเดียสกุลต่อมาที่มีรายงานการพบการติดเชื้อในกุ้งคือ ปรสิต *Pleistophora* sp. (Baxter et al., 1970) ส่วนใหญ่มีรายงานการติดเชื้อในกุ้ง brown shrimp และ white shrimp ในมลรัฐ Texas, Louisiana และ Mississippi โดยปรสิตชนิดนี้จะพบแทรกอยู่ในบริเวณกล้ามเนื้อ และพบน้อยที่บริเวณหัวใจ ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เหนืออก และกระเพาะอาหาร โดยลักษณะสปอร์ของ *Pleistophora* sp. จะมีลักษณะคล้ายกับลูกแพร์ (pyriform) มีความยาว 2.3-3.0 ไมโครเมตร และความกว้าง 1.7-2.5 ไมโครเมตร โดยแต่ละสปอร์จะรวมกันเป็นกลุ่มอยู่ในถุงสปอร์ ซึ่งจะมีขนาดตั้งแต่ 11-50 ไมโครเมตร และแต่ละถุงสปอร์จะประกอบด้วยสปอร์เดี่ยว 14-130 สปอร์ (Overstreet, 1973) ไมโครสปอริเดียอีกสกุลหนึ่งที่พบบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแอตแลนติกในประเทศฝรั่งเศสและชายฝั่งมหาสมุทรแอตแลนติกในประเทศโปรตุเกส โดยกุ้งที่ติดเชื้อจะแสดงอาการกล้ามเนื้อเป็นสีขาวขุ่นอย่างชัดเจน คือ *Inodosporus octospora* สปอร์เดี่ยวมีลักษณะเป็นรูปวงรี (ellipsoidal) มีความยาว 2.0-2.7 ไมโครเมตรและกว้าง 1.0-1.5 ไมโครเมตร โดยสปอร์เดี่ยว 8 สปอร์จะรวมกลุ่มอยู่ในถุงหุ้มสปอร์ (sporophorous vesicle) (Azevedo et al., 2000)

Thelohania เป็นปรสิตในกลุ่มไมโครสปอริเดียที่มีการรายงานการติดเชื้อในกุ้งและครัสตาเซีย *Thelohania penaei* พบการติดเชื้อในกุ้ง white shrimp โดยจะแทรกตัวอยู่ในบริเวณลำตัวของกุ้ง บริเวณกล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลายและเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ และสามารถเห็นการติดเชื้อบริเวณใต้เปลือกส่วนหัว (carapace) (Sprague, 1950) สปอร์มีลักษณะคล้ายลูกแพร์มี 8 สปอร์รวมกลุ่มอยู่ใน 1 ถุงหุ้มสปอร์ แต่ละสปอร์มีความยาว 2.5-4.7

ไมโครเมตร และกว้าง 2.0-3.5 ไมโครเมตร มีเส้นยาว 65-87 ไมโครเมตร กุ้งหุ้มสปอร์มีขนาด 7-12 ไมโครเมตร ชนิดต่อมาของปรสิต *Thelohania* คือ *Thelohania duorata* พบการติดเชื้อในกุ้ง pink shrimp (*P. duorarum*) (Iversen and Maning, 1959) มีรายงานการติดเชื้อในกุ้ง Caribbean brown shrimp (*P. brasiliensis* Latreille) (Iversen and Van Meter, 1964) ซึ่งลักษณะของกุ้งที่ติดเชื้อปรสิตนี้จะพบสปอร์แทรกอยู่ในเส้นใยของกล้ามเนื้อ แต่บางทีอาจจะเข้าไปแทนที่เนื้อเยื่อนั้นอย่างสมบูรณ์ หรืออาจพบบริเวณหัวใจ อวัยวะสืบพันธุ์ สมอ และอวัยวะอื่นๆ โดยสปอร์จะมีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ มีความยาว 4.7-6.8 ไมโครเมตร และความกว้าง 3.4-4.2 ไมโครเมตร มีเส้นยาว 97-142 ไมโครเมตร มีกุ้งหุ้มสปอร์ขนาด 8.5-13.6 ไมโครเมตร แต่ละกุ้งหุ้มสปอร์มีสปอร์เดี่ยวอยู่ 8 สปอร์ (Overstreet, 1973) นอกจากปรสิต *Thelohania* ชนิดที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมีปรสิต *Thelohania* ชนิดอื่นๆ ที่เป็นปรสิตในกุ้งและครัสตาเซียนอื่น ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของปรสิต *Thelohania* ที่พบการติดเชื้อในกุ้งและครัสตาเซียนอื่น

ปรสิต (parasite)	เจ้าบ้าน (host)	แหล่งที่มา (source)
<i>T. palaemonetes</i>	<i>Palaemonetes varians</i>	Codreanu and Codreanu-Balcescu, 1977
<i>T. pallipedis</i>	<i>Austropotomobius pallipes</i>	Cossins and Bowler, 1974
<i>T. maenadis</i>	<i>Carcinus mediterraneus</i> <i>C. maena</i>	Vivares, 1975, Vivares et. al., 1976
<i>T. ceccaldii</i>	<i>Processa edulis edulis</i>	Vivares, 1975
<i>T. octospora</i>	<i>Palaemon serratus</i>	Vivares, 1975
<i>T. contejeani</i>	<i>Austropotamobius pallipes</i>	Maurand, 1966, Vey and Vago 1972, 1973
<i>T. butleri</i>	<i>Pandalus jordani</i>	Harzard and Oldacre, 1975

ที่มา: Iversen and Kelly (1976)

การศึกษาเกี่ยวกับการแพร่ระบาดของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งมีจำนวนน้อย โดยมีรายงานของ Iversen and Kelly (1976) สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อไมโครสปอริเดียได้ โดยการให้ลูกกุ้ง *P. duorarum* กินสิ่งขับถ่ายของปลา spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*) ที่กินกุ้งติดเชื้อไมโครสปอริเดีย และยังมีการใช้ DNA probe ของเชื้อไมโครสปอริเดียตรวจสอบการติดเชื้อ

ไมโครสปอริเดียในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดในบริเวณที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อไมโครสปอริเดีย พบว่ามีปลา 2 ชนิดที่ให้ผลเป็นบวก คือ *Priacanthus tayenus* และ *Scatophagus argus* (Pasharawipas and Flegel, 1994) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแพร่ระบาดของเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งอาจจะต้องอาศัยเจ้าบ้านระยะต้นซึ่งอาจจะเป็นปลาหรือสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาด

สำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งสามารถทำได้โดยนำส่วนที่มีลักษณะสีขาวขุ่นจากกุ้งที่ติดเชื้อไปดบนสไลด์แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจะเห็นสปอร์ชัดเจน และสามารถนับจำนวนสปอร์ที่อยู่ในแต่ละถุงหุ้มสปอร์ได้ (Iversen *et al.*, 1987) และเพื่อให้สามารถเห็นสปอร์ได้ชัดเจนอาจมีการนำไปย้อมสี Giemsa หรือ acid-fast (Lightner, 1996) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาปรสิตไมโครสปอริเดียสกุล *Thelohania (Agmasoma)* ด้วยวิธี DNA Probe หรือ polymerase chain reaction (PCR) (Pasharawipas and Flegel, 1994; Pasharawipas *et al.*, 1997)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยง

ทำการศึกษาในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของเอกชนพื้นที่อำเภอทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีรายงานการเกิดโรคไมโครสปอริเดียในบางฤดูกาลของการเลี้ยง มีบ่อเลี้ยงกุ้งขนาดประมาณ 5 ไร่ จำนวน 3 บ่อ (ภาพที่ 2) และมีบ่อพักน้ำขนาดประมาณ 3 ไร่ จำนวน 1 บ่อ (ภาพที่ 3)

การเตรียมบ่อและวิธีการเลี้ยง

หลังจากจับกุ้ง ดากบ่อเป็นระยะเวลาประมาณ 15 วัน จึงสูบน้ำจากบ่อพักน้ำที่ไม่มีการกำจัดพาหะของโรคต่างๆ ในน้ำ ผ่านผ้ากรองตาข่ายสีฟ้าเพื่อป้องกันสัตว์น้ำอื่นๆ เช่น กุ้ง ปู และปลา เข้าไปในบ่อได้ความลึกประมาณ 1.5 เมตร ความเต็มของน้ำประมาณ 25-30 ฟิตที่ หลังจากนั้นปรับความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ของน้ำโดยใช้วัสดุปูนให้มีค่าระหว่าง 7.5-8.5 แล้วเตรียมอาหารธรรมชาติโดยการเติมปุ๋ยวิทยาศาสตร์รองจนกระทั่งน้ำมีความโปร่งแสงระดับ 50-60 เซนติเมตร จึงเริ่มปล่อยลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 10 (พี 10) ที่ผ่านการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือพีซีอาร์ ว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัสทอรา และไวรัสตัวพิกการ (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus: IHNV) ในอัตราความหนาแน่น 125 ตัวต่อตารางเมตร ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปตลอดการเลี้ยง โดยในช่วงแรกของการเลี้ยงจนกระทั่งกุ้งมีอายุประมาณ 40-50 วันไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อ แต่จะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำและความถี่ของการถ่ายน้ำขึ้นอยู่กับคุณภาพน้ำในแต่ละบ่อ โดยจะมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเพิ่มมากขึ้นในช่วงท้ายๆ ของการเลี้ยง

1.1 ศึกษาลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อและสปอร์ของไมโครสปอริเดีย

เก็บตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียจากบ่อเลี้ยงจำนวน 3 บ่อ บ่อละ 30 ตัว มาศึกษาลักษณะการแพร่กระจายของสปอร์ภายในลำตัวกุ้ง โดยนำกุ้งที่ติดเชื้อมาทำให้สลบด้วยน้ำเย็น แล้วนำมาผ่าจากด้านหลังจนตลอดความยาวของลำตัว สังเกต จดบันทึกและถ่ายภาพลักษณะของความรุนแรงของการติดเชื้อในตัวกุ้ง โดยดูจากเนื้อเยื่อสีขาวที่เกิดจากปรสิตไมโครสปอริเดีย

หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อสีขาวจากกึ่งที่ติดเชื้อ ไมโครสปอริเดียมาวางบนสไลด์หยดด้วยน้ำเกลือหรือน้ำทะเลที่สะอาด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (ภาพที่ 4) นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสง Olympus BX51 Microscope Digital System เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์สดและถ่ายภาพลักษณะและรูปร่างของสปอร์ และเพื่อให้สามารถศึกษาลักษณะสปอร์สดได้ชัดเจนมากขึ้น จึงย้อมด้วยสี Giemsa โดยการนำเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ ไมโครสปอริเดียที่มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวปาดบนสไลด์แล้วผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นนำมาหยดด้วยสี Giemsa ให้ทั่วรอยปาดเนื้อเยื่อบนสไลด์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 30 วินาที จึงปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ (ภาพที่ 5) เพื่อทำเป็นสไลด์กึ่งถาวร แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสง Olympus BX51 Microscope Digital System เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์สดและถ่ายภาพลักษณะและรูปร่างของสปอร์

1.2 ศึกษาลักษณะสปอร์ของ ไมโครสปอริเดียโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope หรือ TEM) และชนิดส่องกราด (scanning electron microscope หรือ SEM)

นำตัวอย่างกึ่งที่ติดเชื้อส่วนหนึ่งมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน โดยใช้ใบมีดตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่มีสีขาวขุ่นของ ไมโครสปอริเดียให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำไปแช่ในน้ำยา glutaraldehyde เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นย้ายตัวอย่างไป post-fix ด้วย osmium tetroxide 1 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้ว dehydrated ในเอทิลแอลกอฮอล์ ตั้งแต่ 50 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และล้างต่อ 2 ครั้งด้วย propylene oxide 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการฝังตัว (embed) ใน epoxy resin 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่าง plastic block มาตัดด้วยเครื่อง ultra microtome โดยใช้ใบมีดเพชร (diamond-knife) ขึ้นแรกตัด semi-thin section ความหนาประมาณ 1 ไมโครเมตร ย้อมด้วย toluidine blue 1 เปอร์เซ็นต์ และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง เพื่อหาตำแหน่งที่ต้องการไปตัด ultrathin section ย้อมด้วย uranyl acetate 2 เปอร์เซ็นต์ และสารละลาย lead citrate 0.3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่านรุ่น JEOL, JEM 1210 electron microscope ณ ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำตัวอย่างกึ่งที่ติดเชื้ออีกส่วนหนึ่งมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องกราด โดยใช้ใบมีดตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่มีสีขาวขุ่นของไมโครสปอริเดียให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วนำไปแช่ในน้ำยา glutaraldehyde 3 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer เป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดต่อไป (ภาคผนวก ข)

1.3 ศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (*Thelohania penaei*) โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) นำตัวอย่างกึ่งที่ติดเชื้อมาสกัดตามวิธีดังนี้

1. เก็บตัวอย่างกึ่งและปลา โดยกึ่งที่ติดเชื้อจะใช้ที่ก้อนเนื้อสีขาวขุ่น ส่วนในปลาจะใช้ส่วนของลำไส้และอวัยวะภายใน เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ 25-50 มิลลิกรัม ใส่ลงในโถงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบดให้ละเอียดหลังจากนั้นใส่ DNAzol 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที

2. เก็บตัวอย่างสารละลายและตะกอนลงใน Eppendrofe แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำ supernatant ใสลง Eppendrofe

3. เติมนเอทานอล 100 % 0.5 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอน DNA จาก lysate กัดับ Eppendrofe ขึ้นลงหลายครั้งเพื่อให้ตัวอย่างผสมกัน แล้วเก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ - 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วค่อยๆ ดูด supernatant ทิ้ง

4. ล้างตะกอน DNA ด้วยเอทานอล 75 % 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง โดยการล้างแต่ละครั้งจะนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอทานอลทิ้ง

5. ตั้ง Eppendrofe เปิดฝาทิ้งไว้ให้แห้ง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม 8 mM NaOH 200 ไมโครลิตร เพื่อละลาย DNA เขย่าให้เพื่อให้สารละลายลงไปอยู่ที่ก้นหลอด แล้วจึงนำไปเก็บตู้เย็นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปผ่านกระบวนการวิเคราะห์ต่อไป

จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการ PCR โดยใช้สารละลาย DNA ของไมโครสปอริเดียที่สกัดได้จากข้อ 1.3 ผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR รวมทั้งหมด 100 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ 20 mM Tris-HCl (pH 8.8 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส), 10 mM KCl, 4 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100 , 0.1 mg bovine serum albumin, 30 pmol ของ primer (I:5'GGTAATACCAACACCAA 3' และ II: 5' GTTTATGAAAGTCTCACC 3') และ 50 mM dNTP หลังจากนั้นเติม 2.5 units ของ Tag polymerase และนำเข้าเครื่อง Thermal cycle ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นใช้จำนวนรอบ 35 รอบที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จึงลดอุณหภูมิลงที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 นาที แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 นาที และปฏิกิริยาสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปเติมลงใน 1.2 % agarose gel ซึ่งอยู่ในเครื่อง electrophoresis แล้วผ่านด้วยกระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปวางบนเครื่อง ultraviolet transilluminator เพื่อดูผลที่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพบันทึกผล (Pasharawipas *et al.*, 1997)

1.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกิ้งก่าแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย

นำกิ้งก่าที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียที่มีความรุนแรงของการติดเชื้อแตกต่างกันไปตรึง (fix) โดยการฉีดด้วยน้ำยา Davison's fixative และคอง โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนน้ำยาที่ใช้คองตัวอย่างเป็นเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วจึงเลือกตัดชิ้นเนื้อกิ้งก่าในบริเวณที่ต้องการศึกษาบรรจุใน embedding cassette แล้วนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bell and Lightner (1988) จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน (embedding) ตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร นำไปย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) และ Giemsa จากนั้นทำเป็นสไลด์ถาวร (ภาคผนวก ค) เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

1.5 การศึกษาระดับของความรุนแรงในการติดเชื้อไมโครสปอริเดียต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยง

การศึกษาระดับความรุนแรงจากการติดเชื้อไมโครสปอริเดียหลังจากปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงในบ่อ มีการสังเกตความผิดปกติของกุ้งที่เข้าไปในบ่อในช่วงระยะเวลา 20 วันแรกของการเลี้ยง เนื่องจากกุ้งยังมีขนาดเล็กไม่สามารถสุ่มตัวอย่างโดยใช้แหได้ โดยกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะมีลักษณะเป็นก้อนสีขาวบริเวณส่วนหัว (carapace) และลำตัว (ภาพที่ 6) หลังจากการเลี้ยงนานประมาณ 45 วัน จะเริ่มสุ่มกุ้งโดยใช้แหหลังจากนั้นใช้แหสุ่มทุก 15 วัน (ภาพที่ 7) โดยจะสุ่มบ่อละ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 300-500 ตัว โดยจะสุ่มในบริเวณแตกต่างกันในบ่อ และกุ้งที่ได้จากการสุ่มจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียทั้งในตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อบริเวณลำตัว กลุ่มที่ 2 กุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียเฉพาะบริเวณกล้ามเนื้อลำตัว และกลุ่มที่ 3 กุ้งปกติที่ไม่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (ภาพที่ 8) โดยจะสุ่มกุ้งทั้ง 3 กลุ่ม มาชั่งน้ำหนัก และบันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 120 วัน จึงจับกุ้งและนำผลผลิตที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณหาอัตราการรอดตาย นำข้อมูลทั้งหมดมาเปรียบเทียบทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างของการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และจำนวนของกุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียทั้ง 3 กลุ่ม ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($P=0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 for Windows

2. การศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

2.1 การศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวในห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างสัตว์น้ำที่อยู่ในบ่อพักน้ำและบ่อเลี้ยงกุ้งในการศึกษาที่ 1 เช่น ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) (ภาพที่ 9) ปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) (ภาพที่ 10) ปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) (ภาพที่ 11) และกลุ่มแพลงก์ตอนสัตว์บางชนิด โดยจะนำตัวอย่างอวัยวะภายในบางส่วนของปลาเก็บแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือพีซีอาร์ว่ามีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียหรือไม่ตามวิธีการของ Pasharawipas *et al.* (1997) ส่วนตัวอย่างสัตว์น้ำอีกส่วนหนึ่งนำมาดองด้วยน้ำยา Davison's fixative เพื่อนำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกันกับในข้อ 1.4

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างสัตว์น้ำที่อยู่ในบ่อพักน้ำและบ่อเลี้ยงกุ้งในการศึกษาที่ 1 มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 400 ลิตร เพื่อปรับสภาพเป็นระยะเวลา 14 วัน และนำกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว่า 7 จากโรงเพาะฟักเอกชนที่ได้ผ่านการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือพีซีอาร์ ว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัสทอรา ไวรัสตัวพิการและเชื้อไมโครสปอริเดีย มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 400 ลิตร เป็นระยะเวลา 3 วันลูกกุ้งจะเข้าสู่ระยะโพสลาร์ว่า 10 (พี 10) หลังจากนั้นจึงนำมาแบ่งเป็นกลุ่มทดลองต่างๆ ต่อไป

2.2.1 การเตรียมการทดลอง

ทดลองในตู้กระจกขนาดความจุ 100 ลิตรที่มีน้ำความเค็มประมาณ 25-30 พีพีที จำนวน 12 ตู้ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 12)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม นำลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะ พี 10 ใส่ในตู้กระจก ตู้ละ 100 ตัว จำนวน 3 ตู้ ให้อาหารลูกกุ้งเบอร์ 1 วันละ 3 มื้อ

กลุ่มที่ 2 นำลูกกุ้งระยะพี 10 ใส่ในตู้กระจก ตู้ละ 100 ตัว จำนวน 3 ตู้ การให้อาหารลูกกุ้งกลุ่มทดลองนี้จะให้อาหารสำเร็จรูปพร้อมกับการให้กินสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำที่ให้กินเนื้อกุ้งและอวัยวะของกุ้งขาวส่วนที่มีสีขาวที่เกิดจากการติดเชื้อไมโครสปอริเดียร่วมด้วย

กลุ่มที่ 3 นำลูกกุ้งระยะพี 10 ใส่ในตู้กระจก ตู้ละ 100 ตัว จำนวน 3 ตู้ การให้อาหารลูกกุ้งกลุ่มทดลองนี้จะให้อาหารสำเร็จรูปพร้อมกับการให้กินเนื้อกุ้งและอวัยวะของกุ้งขาวส่วนที่มีสีขาวที่เกิดจากการติดเชื้อไมโครสปอริเดียร่วมด้วย

กลุ่มที่ 4 นำดินเลนพื้นบ่อกุ้งในการศึกษาที่ 1 มาใส่ในตู้กระจก จำนวน 3 ตู้ หลังจากนั้นนำลูกกุ้งระยะพี 10 ปล่อยตู้ละ 100 ตัว การให้อาหารลูกกุ้งกลุ่มทดลองนี้จะให้อาหารสำเร็จรูปพร้อมกับการให้กินสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำที่ให้กินเนื้อกุ้งและอวัยวะของกุ้งขาวส่วนที่มีสีขาวที่เกิดจากการติดเชื้อไมโครสปอริเดียร่วมด้วย

สังเกตความผิดปกติภายนอก และเก็บตัวอย่างกึ่งทดลองทุกๆ 7 วัน มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตัวอย่างลูกกึ่งบางส่วนนำไปตรึงด้วยน้ำยา Davison's fixative และผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bell and Lightner (1988) เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียต่อไป ส่วนตัวอย่างกึ่งบางส่วนจะนำไปตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยการเก็บเนื้อเยื่อส่วนตับและตับอ่อน ถ้าได้ และกลั่นเนื้อลำตัว เพื่อยืนยันว่ามีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียหรือไม่ โดยมีระยะเวลาการทดลองนาน 2 เดือน

2.3 การทดลองการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกึ่งขาวแวนนาไมในฟาร์มเลี้ยง

ก้นคอกในบ่อพักน้ำขนาด 3 ไร่ ในฟาร์มเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย โดยนำมุ้งในลอนสีฟ้าขนาด 26 ตาต่อตารางนิ้วก้นคอกในบ่อพักน้ำขนาดกว้าง 3 เมตร ยาว 6 เมตร (ภาพที่ 13) หลังจากนั้นนำลูกกึ่งขาวแวนนาไมระยะพี 10 ที่ผ่านการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือพีซีอาร์ ว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัสทอรา ไวรัสตัวพิการและไมโครสปอริเดีย มาปล่อยในอัตราความหนาแน่น 125 ตัวต่อตารางเมตร โดยจะมีการสังเกตความผิดปกติภายนอกทุก 15 วัน เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน และเมื่อพบอาการผิดปกติที่คล้ายกับการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย นำส่วนที่ผิดปกติไปปาดบนสไลด์และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเก็บตัวอย่างลูกกึ่งบางส่วนนำไปตรึง โดยแช่ด้วยน้ำยา Davison's fixative และผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bell and Lightner (1988) เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียต่อไป

3. การศึกษาผลของฤดูกาลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกึ่งขาวแวนนาไม

ทำการศึกษาในฟาร์มเลี้ยงกึ่งขาวแวนนาไมของเอกชนฟาร์มเดียวกับข้อ 1 โดยทำการศึกษาในสองรอบการเลี้ยงคือ การเลี้ยง รอบที่ 1 ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึง กุมภาพันธ์ 2551 และรอบที่ 2 ช่วงเดือนพฤษภาคม 2551 ถึง เดือนสิงหาคม 2551 โดยเริ่มสุ่มกึ่งด้วยแหเมื่อเลี้ยงกึ่งนาน 45 วัน และบันทึกข้อมูลปริมาณการติดเชื้อไมโครสปอริเดียโดยใช้แหสุ่มกึ่งทุก 15 วัน โดยจะสุ่มบ่อละ 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 300-500 ตัว จะสุ่มในบริเวณแตกต่างกันในบ่อ จนกระทั่งจับกึ่ง และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียของทั้งสองรอบการเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีการเก็บตัวอย่างกึ่งแซบวัยที่เลี้ยงแบบดั้งเดิมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียในพื้นที่จังหวัดสมุทรสาครและ

สมุทรปราการ โดยเก็บตัวอย่างกุ้งแชบ๊วยฟาร์มละ 10-20 ตัว และนำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาลักษณะภายนอกและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วยที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย

4. ศึกษาผลของการใช้คลอรีนต่ออัตราการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย อัตราการรอดตาย และผลผลิตในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ทำการศึกษาในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเอกชนในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ที่เคยมีรายงานการเกิดโรคกุ้งหลังขาในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วยในธรรมชาติมาก่อน ซึ่งมีบ่อเลี้ยงขนาด 4 ไร่ (6,400 ตารางเมตร) จำนวน 10 บ่อ (ภาพที่ 14) และบ่อพักน้ำขนาดใกล้เคียงกัน 2 บ่อ โดยแต่ละบ่อเลี้ยงปูด้วยโพลีเอทิลีนบริเวณคันบ่อลงไปจนถึงบริเวณแนวหัวอาหารประมาณ 5 เมตรจากขอบบ่อ ความเค็มของน้ำตลอดระยะเวลาการเลี้ยงอยู่ระหว่าง 25-30 พีพีที

การเตรียมบ่อและวิธีการเลี้ยง

หลังจากจับกุ้ง จากการเลี้ยงในรอบที่ผ่านมา ตากบ่อและนำเลนบริเวณกลางบ่อออกจากบ่อเลี้ยง และสูบน้ำจากบ่อพักน้ำที่พักมาเป็นระยะเวลานาน 2 สัปดาห์เข้าบ่อเลี้ยงทั้ง 10 บ่อจนได้ความลึกประมาณ 1.5 เมตร โดยบ่อเลี้ยงกุ้ง 5 บ่อ (บ่อทดลอง) เติมคลอรีนผงที่มีสารออกฤทธิ์ 60 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 35 กิโลกรัมต่อไร่ (18 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งในอัตราส่วนความเข้มข้นนี้ เป็นความเข้มข้นที่ใช้ทั่วไปสำหรับการเตรียมน้ำเพื่อใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งในโรงเพาะฟักซึ่งสามารถกำจัดพาหะนำโรคต่างๆ ได้ (ชโล, 2543) ในขณะที่ใส่คลอรีนจะเปิดเครื่องให้อากาศเพื่อให้คลอรีนกระจายทั่วบ่อจะกระทั่งประมาณ 2-3 ชั่วโมง จึงปิดเครื่องให้อากาศเพื่อให้คลอรีนคงสภาพได้นานออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ไม่สลายตัวเร็วเกินไป ส่วนบ่อเลี้ยงอีก 5 บ่อ (บ่อควบคุม) ไม่มีการเติมคลอรีนมีเพียงการเปิดเครื่องให้อากาศเท่านั้น หลังจากนั้น 1 สัปดาห์เติมปุ๋ยวิทยาศาสตร์และรำข้าวเพื่อให้เกิดแพลงก์ตอนพืชและอาหารธรรมชาติในปริมาณที่เหมาะสมก่อนที่จะนำลูกกุ้งมาปล่อยโดยการวัดความโปร่งแสงของน้ำด้วย Secchi disc ให้อยู่ระหว่าง 50-60 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะพี 10 ที่ผ่านการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสดวงขาว ไวรัสหัวเหลือง ไวรัสทอรา ไวรัสตัวพิการและไมโครสปอริเดีย มาปล่อยในอัตราความหนาแน่น 80 ตัวต่อตารางเมตร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปตลอดการเลี้ยง ไม่มีการถ่ายน้ำและเติมน้ำเข้าบ่อในช่วง 40-50 วันแรกของการเลี้ยง มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำเมื่อ

ระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำและความถี่ของการถ่ายน้ำขึ้นอยู่กับคุณภาพน้ำในแต่ละบ่อ การเปลี่ยนถ่ายน้ำจะเพิ่มมากขึ้นในช่วงท้ายๆ ของการเลี้ยง

การศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อในระหว่างการเลี้ยง

สังเกตความผิดปกติของกุ้งที่มีการติดเชื้อในระหว่างการเลี้ยงกุ้ง โดยตรวจดูกุ้งที่เข้าไปในบ่อ และหลังจากนั้นเมื่อกุ้งมีอายุประมาณ 30 วันจะประเมินเปอร์เซ็นต์กุ้งที่ติดเชื้อจากการสุ่มกุ้งโดยใช้แหทุก 10 วัน โดยจะสุ่มบ่อละ 3 ครั้ง ในจุดต่าง ๆ กัน บันทึกความรุนแรงของกุ้งที่ติดเชื้อของกุ้งทั้งสองกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงหลังจากเลี้ยงกุ้ง 120 วัน จึงจับกุ้งและนำผลผลิตที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณหาผลผลิตและอัตราการรอดตาย เพื่อนำมาเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี

Independent Samples Test (t-test) โดยใช้โปรแกรม SPSS 13.0 for Windows



ภาพที่ 2 บ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในอำเภอทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ที่พบการติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดีย



ภาพที่ 3 บ่อพักน้ำขนาด 3 ไร่ ของฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่พบการติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียม



ภาพที่ 4 การนำเนื้อเยื่อสีขาวจากกุ้งที่ติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียมมาศึกษาลักษณะของสปอร์สด



ภาพที่ 5 การนำเนื้อเยื่อสีขาวจากกุ้งที่ติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียมมาช้อมด้วยสี Giemsa เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์



ภาพที่ 6 กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมมีลักษณะเป็นก้อนสีขาวบริเวณหัวและลำตัวซึ่งจะพบในขอยในช่วง 20 วันแรกของการเลี้ยง



ภาพที่ 7 การตรวจสอบความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียโดยการสุ่มกุ้งด้วย
แห เมื่ออายุกุ้ง 45 วันและทำการสุ่มทุก 15 วันจนกระทั่งจับกุ้ง



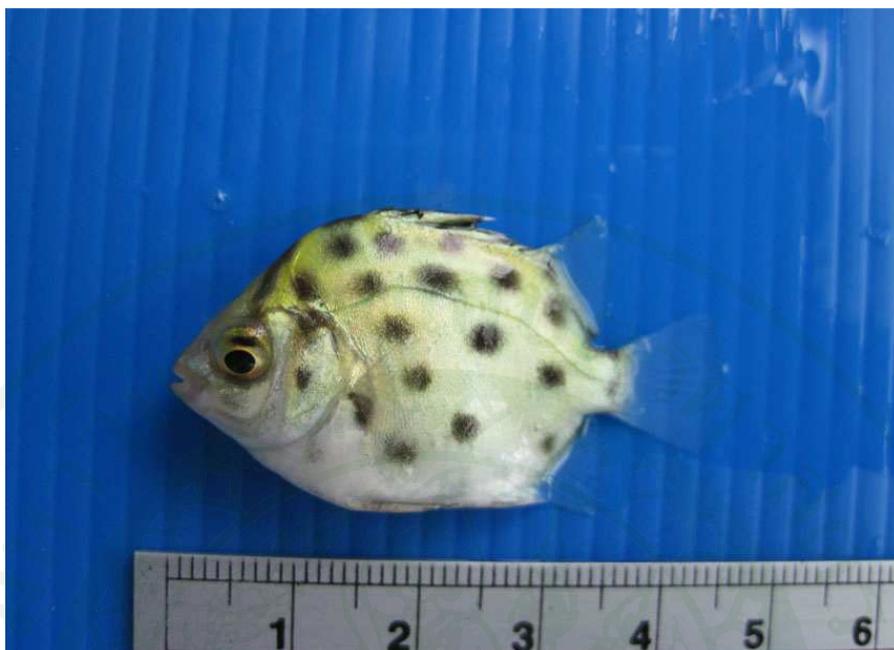
ภาพที่ 8 กุ้งติดเชื้อไมโครสปอริเดียแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กุ้งที่ติดเชื้อทั้งในตับและ
ตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัว (ตัวล่าง) กลุ่มที่ 2 กุ้งที่มีการติดเชื้อเฉพาะบริเวณกล้ามเนื้อ
ลำตัว (ตัวกลาง) และกลุ่มที่ 3 กุ้งปกติ (ตัวบน)



ภาพที่ 9 ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย



ภาพที่ 10 ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) จากโรงเพาะของเอกชนเพื่อทดลองการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไม



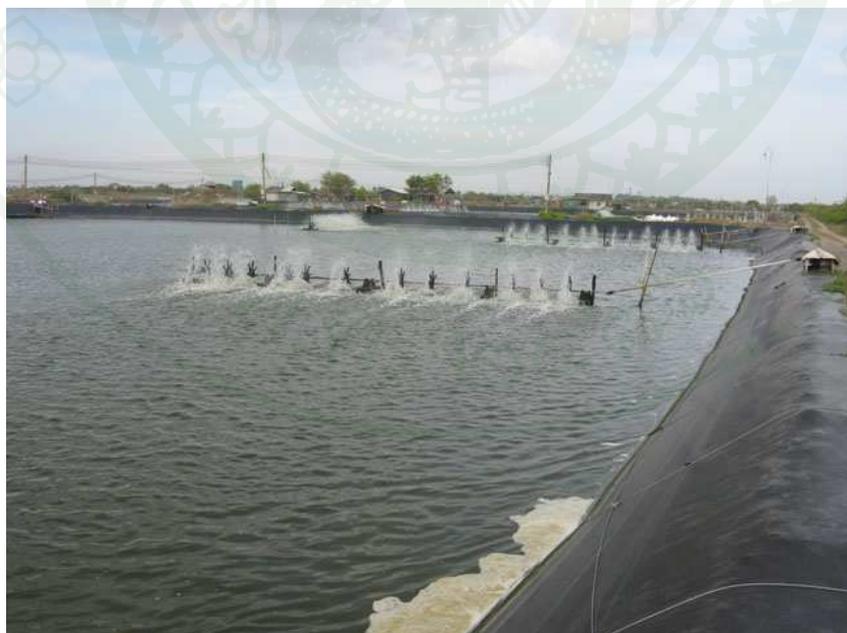
ภาพที่ 11 ปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) ที่จับจากธรรมชาติเพื่อนำมาทดลองการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมในกุ้งขาวแวนนาไม



ภาพที่ 12 ตู้กระจกขนาด 100 ลิตรที่ใช้ในการทดลองการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมในกุ้งขาวแวนนาไม



ภาพที่ 13 การทดลองการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียในลูกกุ้งที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน
ในคอกที่อยู่ในบ่อพักน้ำ



ภาพที่ 14 ฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในจังหวัดนครศรีธรรมราชที่ใช้ในการ
ทดลองการใช้คลอรีนเตรียมน้ำ

ผลและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียและความรุนแรงของโรคในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

หลังจากเริ่มปล่อยลูกกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงตรวจสอบลักษณะกุ้งที่เข้าไปในบ่อพบว่า กุ้งเริ่มมีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียเมื่ออายุประมาณ 20-25 วัน สังเกตเห็นบางส่วนของลำตัวมีสีขาว ขุ่นคล้ายน้ำมันอยู่ภายใต้เปลือก (ภาพที่ 15) หลังจากกุ้งมีการเจริญเติบโตและมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะสีขาวขุ่นจะขยายใหญ่เพิ่มขึ้น ทำให้มองเห็นได้ชัดเจนมากขึ้นเรื่อยๆ โดยจะเห็นก่อนสีขาวขุ่นของกลุ่มปรสิตรตามส่วนต่างๆ ของตัวกุ้ง ได้ตั้งแต่ส่วนหัว (carapace) ไปจนถึงส่วนหาง (telson) ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการติดเชื้อ (ภาพที่ 16) และเมื่อนำกุ้งติดเชื้อมาผ่าตามแนวยาวของลำตัว พบว่าก่อนสีขาวขุ่นคือปรสิตรไมโครสปอริเดียที่แทรกอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อของลำตัวกุ้ง รวมถึงบริเวณตับและตับอ่อน ภาวะอาหารและอวัยวะอื่นๆ ของกุ้งด้วย (ภาพที่ 17) ซึ่งลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ ชลอ (2534) ที่พบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง และเมื่อนำก่อนสีขาวขุ่นตามส่วนต่างๆ ของตัวกุ้ง มาปาดบนสไลด์แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วพบว่าสปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์ อยู่ในถุงหุ้มสปอร์ (sporophorous vesicle) มีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร (ภาพที่ 18) และเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa สปอร์จะติดสีน้ำเงินชัดเจน (ภาพที่ 19) ซึ่งการที่ปริมาณกุ้งที่ติดเชื้อเข้ามากินอาหารในบ่อเป็นจำนวนมากและส่วนใหญ่จะมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ เนื่องจากกุ้งที่ติดเชื้ออ่อนแอกว่ากุ้งปกติ ไม่สามารถแก่งแย่งอาหารบนพื้นบ่อกับกุ้งส่วนใหญ่ที่มีสุขภาพแข็งแรงในบ่อได้ จึงเข้าไปกินอาหารในบ่อแทนในขณะที่กุ้งปกติที่มีขนาดโตกว่ากินอาหารในบริเวณพื้นบ่อในช่วงเวลาที่ยังมีอาหารเหลืออยู่ แต่จากการใช้เห็บส้มตัวอย่างกุ้งในบ่อ เพื่อต้องการทราบอัตราการติดเชื้อ จะพบว่าเปอร์เซ็นต์กุ้งที่ติดเชื้อเมื่อกุ้งอายุระหว่าง 45-75 วัน จะไม่แตกต่างกันมาก แต่ถ้าสังเกตปริมาณกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียที่เข้าไปในบ่อแล้วจะพบว่าเปอร์เซ็นต์ของกุ้งที่ติดเชื้อมีสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนกุ้งที่เข้าไปกินอาหารในบ่อทั้งหมด ดังนั้นการประเมินอัตราการติดเชื้อที่แม่นยำและใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุดคือการ ใช้เห็บส้มกุ้งหลายๆ จุดในบ่อ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของกุ้งที่ติดเชื้อ

จากการเก็บข้อมูลการสุ่มกุ้งโดยการทอดแห ในช่วงเวลาที่พบกุ้งในบ่อติดเชื้อและมีอาการหลังขาวมากที่สุดคืออายุประมาณ 60 วันทุกบ่อ แต่ปริมาณจะแตกต่างกันระหว่าง 25.3 ± 1.12

เปอร์เซ็นต์ ถึง 28.5 ± 0.78 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) กุ้งที่ติดเชื้อแต่ละตัวจะแตกต่างกันด้วย กุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในปริมาณมาก คือมีลักษณะสีขาวยุ่นเกือบตลอดลำตัว จะอ่อนแอกว่า กุ้งที่ติดเชื้อในปริมาณน้อยกว่า (ภาพที่ 20) ดังนั้นจะพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อมากมักจะเข้าไปหาอาหารในยอมมากกว่ากุ้งขาวที่ไม่ติดเชื้อ ดังนั้นเมื่อสังเกตตลอดระยะเวลาตั้งแต่ที่มีกุ้งติดเชื้อในปริมาณมากที่สุด กุ้งเหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตช้ากว่ากุ้งปกติทั่วไปในบ่อ และบางตัวจะเคลื่อนไหวไม่รวดเร็วเหมือนกุ้งปกติ และจะพบกุ้งป่วยเหล่านี้ตายและลอยบริเวณผิวน้ำบ้าง (ภาพที่ 21) แต่ส่วนใหญ่กุ้งป่วยจะอ่อนแอและทยอยตาย หรืออาจจะถูกกุ้งขาวในบ่อที่แข็งแรงกว่ากิน ทำให้ปริมาณกุ้งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อกุ้งมีอายุประมาณ 90 วัน จะสังเกตเห็นกุ้งขาวที่ติดเชื้อเข้ามากินอาหารในยอมน้อยลงและน้อยมากเมื่อกุ้งอายุ 105 วัน ดังนั้นความรุนแรงและความเสียหายที่เกิดขึ้นจากโรคนี้อาจจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับจำนวนกุ้งที่ติดเชื้อในบ่อตั้งแต่ในระยะแรก ตัวอย่างเช่น เมื่อกุ้งมีอายุ 60 วัน จากการประเมินปริมาณกุ้งในบ่อที่ 1 ติดเชื้อสูงสุด 27.7 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ของกุ้งทั้งหมด เมื่อเลี้ยงต่อไปจนถึงระยะเวลาจับกุ้งจะมีกุ้งหายไปหรือลดลงไปเฉพาะ 27.7 ± 1.25 เปอร์เซ็นต์ที่ติดเชื้อนี้เท่านั้น (ตารางที่ 2) ไม่พบว่าในขณะที่จับกุ้งมีกุ้งขาวบางส่วนอยู่ในระยะเริ่มติดเชื้อไมโครสปอริเดีย แสดงว่าการติดเชื้อชนิดนี้เกิดขึ้นในระยะแรกๆ ที่เริ่มปล่อยลูกกุ้งเท่านั้น ส่วนการเติมน้ำในช่วงเวลาหลังจาก 45 วัน ไปแล้วไม่มีผลต่อการติดเชื้อเพิ่มเติม อาจจะเป็นเพราะสภาพแวดล้อมในบ่อไม่เหมาะสม เนื่องจากมีปริมาณกุ้งจำนวนมาก ซึ่งมีขนาดใหญ่ ทำให้น้ำขุ่นและมีตะกอนมากกว่าในขณะที่เตรียมน้ำก่อนปล่อยลูกกุ้ง นอกจากนั้นการติดเชื้อในบ่อจะไม่เพิ่มขึ้น แม้ว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะถูกกุ้งปกติกินและสปอร์จากกุ้งป่วยจะเข้าไปในร่างกายกุ้งปกติก็ตาม เนื่องจากวงจรชีวิตของไมโครสปอริเดียต้องอาศัยเจ้าบ้านชนิดอื่นก่อนที่กุ้งจะกินเชื้อนี้เข้าไป การติดเชื้อจึงจะเกิดขึ้นได้ ซึ่งปลาอาจจะเข้าบ้านระยะต้น (intermediate host) ก่อนจะขับถ่ายของเสีย ซึ่งมีสปอร์ของไมโครสปอริเดียปะปนออกมาด้วยในแหล่งน้ำ เมื่อกุ้งขาวกินอาหารตามพื้นบ่อหรืออาหารที่มีสปอร์ปะปนอยู่เชื้อก็จะเข้าไปในตัวกุ้งและเจริญพัฒนาต่อไปจนเกิดลักษณะหลังขาว ดังที่กล่าวมาแล้วซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Iversen and Kelly (1976) พบว่าถ้าให้กุ้ง *P. duorarum* ระยะโพสลาร์วากินสิ่งที่ขับถ่ายของปลา spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*) ซึ่งได้กินกุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะทำให้กุ้งเกิดการติดเชื้อในเวลาต่อมาได้

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยง

บ่อเลี้ยง	ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)					
	45	60	75	90	105	120
1	20.5±1.23	27.7±1.25	24.9±0.89	18.5±2.12	5.8±2.25	3±1.01
2	18.6±1.52	25.3±1.12	24.1±1.02	21.5±1.54	8.0±1.01	4.2±1.68
3	22.6±0.98	28.5±0.78	23.8±1.35	19.5±2.02	7.2±1.35	3.3±1.21



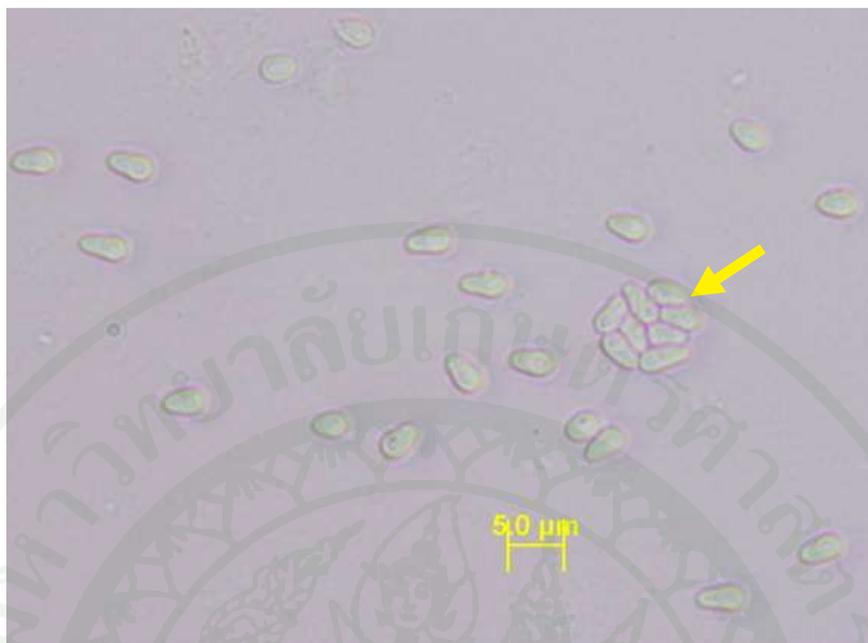
ภาพที่ 15 กุ้งขาวแวนนาไมอายุ 20-25 วัน เริ่มพบการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย



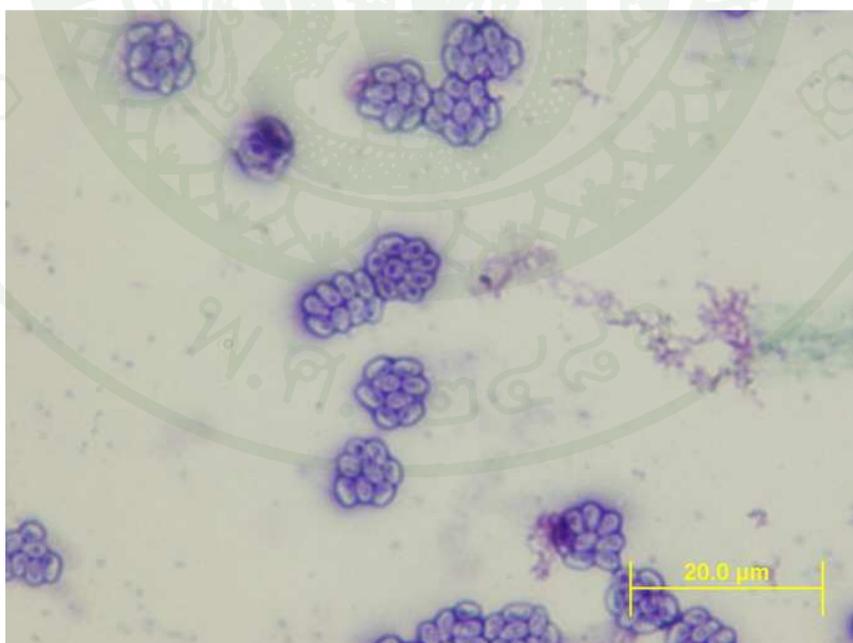
ภาพที่ 16 กุ้งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมีลักษณะก้อนสีขาวขุ่นของกลุ่มปรสิตตามส่วนต่างๆ ของลำตัวตั้งแต่ส่วนหัวไปจนถึงส่วนหาง



ภาพที่ 17 ภาพกุ้งติดเชื้อผ่าตามแนวยาวของลำตัว พบว่าก้อนสีขาวขุ่นของไมโครสปอริเดียแทรกอยู่ระหว่างส่วนต่างๆ ภายในตัวกุ้ง



ภาพที่ 18 สปอร์ของไมโครสปอริเดียมีรูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์ อยู่ในถุงหุ้มสปอร์ (sporophorous vesicle) (สรชี้)



ภาพที่ 19 สปอร์ของไมโครสปอริเดียเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa จะติดสีน้ำเงินชัดเจน



ภาพที่ 20 กุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมรุนแรงมากมีลักษณะสีขาวยุ่นเกือบตลอดลำตัว



ภาพที่ 21 กุ้งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมรุนแรงบางส่วนจะอ่อนแอและพบตายลอยบริเวณผิวน้ำ

2. การศึกษาสปอร์เพื่อจำแนกชนิดของไมโครสปอริเดียจากกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไมจาก 2 พื้นที่ คือ ฟาร์มเลี้ยงกุ้งในจังหวัดนครศรีธรรมราชและฟาร์มเลี้ยงกุ้งในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งระยะเวลาที่กุ้งขาวเริ่มติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะใกล้เคียงกันคือประมาณ 20-30 วัน หลังจากปล่อยลูกกุ้ง สังเกตเห็นว่ากุ้งที่ติดเชื้อจากทั้ง 2 พื้นที่ มีลักษณะเหมือนกันคือ บริเวณใต้เปลือกตามส่วนต่างๆ ของกุ้งจะมีสีขาวคล้ายน้ำนม โดยส่วนใหญ่พบบริเวณส่วนหัวจนถึงกลางลำตัว (ภาพที่ 22) และเมื่อผ่ากุ้งตามยาวของลำตัวพบว่าส่วนที่เห็นเป็นเนื้อเยื่อสีขาวคล้ายน้ำนมมีลักษณะที่แตกต่างจากกล้ามเนื้อของลำตัวสามารถดึงหรือแยกออกจากกล้ามเนื้อได้ (ภาพที่ 23) กุ้งบางตัวจะมีการติดเชื้อนี้รุนแรงเกือบทั้งตัว มีสีขาวขุ่นของไมโครสปอริเดียแต่บางตัวมีการติดเชื้อเพียงเล็กน้อย

เมื่อนำส่วนเนื้อเยื่อที่เป็นสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมมาปาดบนสไลด์แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์อยู่ใน sporophorous vesicle (ภาพที่ 24) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของปรสิตไมโครสปอริเดียสกุล *Thelohania* (*Agmasoma*) และเมื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไม่พบการเกิด encapsulation หรือ xenoma formation ในส่วนต่างๆ ของเซลล์เจ้าบ้านที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไมโครสปอริเดียสกุลนี้ที่แตกต่างจากสกุลอื่นๆ (Lom and Dykova, 1992) นอกจากนี้เมื่อนำสปอร์สดมาย้อมด้วยสี Giemsa จะสังเกตเห็นสปอร์ติดสีน้ำเงินชัดเจน (ภาพที่ 25) และสามารถเห็นความแตกต่างของระยะสปอร์ของไมโครสปอริเดียได้ โดยสปอร์ที่พัฒนาสมบูรณ์จะติดสีเข้มกว่าสปอร์ที่ยังมีการพัฒนาไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 26) และเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเทคนิคพีซีอาร์พบว่ากุ้งตัวอย่างที่ทำการศึกษาให้ผลบวกกับการติดเชื้อปรสิตดังกล่าว (ภาพที่ 27) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 500 bp ขึ้น ผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการรายงานของ Pasharawipas *et al.* (1997) ซึ่งใช้ PCR primer ชุดเดียวกันนี้ในการศึกษาการติดเชื้อ *T. penaei* ในกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วยโดยในการศึกษาดังกล่าวได้ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 574 bp ขึ้น และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่ผลผลิต PCR จากการศึกษาทั้งสองครั้งนี้ให้ผลที่แตกต่างกันทั้งๆ ที่ใช้ PCR primer ชุดเดียวกันอีกทั้งรูปร่างและลักษณะภายนอกของไมโครสปอริเดียที่ทำการศึกษาทั้งจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและการย้อมสีสปอร์จากการศึกษาครั้งนี้และตามรายงานของ Pasharawipas *et al.* (1997) ทั้งสองครั้งล้วนมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ และเมื่อนำผลผลิต PCR ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) และนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างกับจีโนมของ *T. penaei* พบว่าได้ผล ดังภาพที่ 28 จะเห็นได้ว่าผลผลิต PCR ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับ *T. penaei* ที่รายงานไว้ก่อน

หน้านี้แต่มีความแตกต่างกันอยู่บ้างจึงเป็นไปได้ว่า เชื้อไมโครสปอริเดียที่ทำการศึกษานี้
อาจจะเป็น species ใหม่ที่มีความคล้ายคลึงเป็นอย่างมากกับ *T. penaei*

เมื่อนำปรสิตไมโครสปอริเดียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งขาวมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะพบว่าบริเวณส่วนที่มีสีขาวขุ่นเกือบทั้งหมดเป็นส่วนของ
sporophorous vesicle ที่มีขนาดแตกต่างกันไปตามระยะการแบ่งตัว (ภาพที่ 29) ซึ่งภายใน
ประกอบด้วยสปอร์เดี่ยวๆ รูปไข่อยู่ภายใน (ภาพที่ 30) โดยปรสิต *T. penaei* จำนวนมากจะพบ
แทรกอยู่ในอวัยวะตับและตับอ่อน (ภาพที่ 31) และแทรกอยู่ระหว่างใยกล้ามเนื้อ (muscle fibers)
(ภาพที่ 32) นอกจากนี้ยังพบมากบริเวณ โคครอบเกือบตลอดความยาวลำไส้ของกุ้งที่ติดเชื้อรุนแรง
(ภาพที่ 33) และภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดจะพบปรสิตไมโครสปอริเดีย
ล้อมรอบลำไส้กุ้งเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 34) และจากการศึกษาตัวอย่างที่ย้อมด้วย toluidine blue
ในอวัยวะตับและตับอ่อน (ภาพที่ 35) และกล้ามเนื้อลำตัว (ภาพที่ 36) ของกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริ
เดียจะพบว่าไมโครสปอริเดียแทรกอยู่ภายในเป็นจำนวนมาก เมื่อนำบริเวณที่มีปรสิตจำนวนมาก
ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านจะพบว่า มีหลายระยะของปรสิตชนิด
นี้ ตั้งแต่ระยะเริ่มของการแบ่งตัว ซึ่งล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้ม sporophorous vesicle โดยส่วนใหญ่
ระยะแรกของการแบ่งตัว (merogony) จะพบในบริเวณกล้ามเนื้อและตับและตับอ่อน (ภาพที่ 37)
การแบ่งตัวในระยะแรกๆ สังเกตได้จากนิวเคลียสจะเป็นแบบ diplokaryotic cells (มีนิวเคลียสสอง
อันแต่มีด้านใดด้านหนึ่งติดกัน) โดยเซลล์นี้จะล้อมรอบด้วย irregular thin plasmalemma contour
และภายในไซโทพลาสซึมประกอบด้วย ไรโบโซม (ribosome) นิวเคลียสมีขนาดเล็กที่ภายในมีโคร
มาติน (chromatin) และนิวคลีโอลัส (nucleolus) (ภาพที่ 38) ระยะ sporont ที่เกิดจากแบ่งตัว
ช่วงแรกจะแยกจาก meront อย่างชัดเจนด้วย plasmalemma ที่มีความหนาเพิ่มขึ้นและในไซ
โทพลาสซึมจะมีไรโบโซมน้อย หลังจากนั้นจะเกิดเยื่อหุ้มที่แยกออกในแนวขนานอย่างชัดเจน
(ภาพที่ 39) และเริ่มเห็นเยื่อหุ้ม sporophorous ในระยะสุดท้ายของการเกิด sporont จะมีการแบ่งตัว
แบบ cytokinesis เกิดเป็นสปอร์เดี่ยว 8 สปอร์ ใน 1 sporophorous vesicle ซึ่งปรสิต *T. penaei* ใน
แต่ละ sporophorous vesicle นั้นจะมีสปอร์เดี่ยวอยู่ 8 สปอร์

แต่สำหรับการศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านครั้งนี้สามารถตัดผ่านได้
มากที่สุดเพียง 7 สปอร์ในแต่ละ sporophorous vesicle โดยสปอร์เดี่ยวเหล่านี้จะอยู่ชิดกันและเชื่อม
กันด้วยเนื้อเยื่อสีเข้ม แต่ละเซลล์เชื่อมติดกันด้วยเยื่อหุ้มที่มีสามชั้นซึ่งสามารถจะเห็นแยกชั้นชัดเจน
เมื่อดูด้วยกำลังขยายที่มากขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงภายในสปอร์จะมีดังนี้คือ ไซโทพลาสซึม

หนาแน่นขึ้นและมี anchoring disc, polar filament และ posterior vacuole (ภาพที่ 40) สปอร์เดี่ยวๆ ที่อยู่ในระยะเต็มวัย (mature spore) ของปรสิตชนิด *T. penaei* ซึ่งมี 8 สปอร์อยู่ภายใน แต่ละ sporophorous vesicle สปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ที่มีความกว้าง 2.09 ไมโครเมตร (1.17 - 3.45 ไมโครเมตร) และมีความยาว 3.16 ไมโครเมตร (2.66 - 4.42 ไมโครเมตร) ผนังสปอร์หนาประกอบด้วย exospore และ endospore ซึ่ง exospore มีลักษณะแถบมืดสลับแถบสว่างที่มีความหนา 0.08 ไมโครเมตร (0.03-0.14 ไมโครเมตร) และ endospore หนา 0.18 ไมโครเมตร (0.08-0.27 ไมโครเมตร) (ภาพที่ 41) และภายในสปอร์จะมี polar filament ที่มีลักษณะเป็นท่อยาวอยู่ใกล้กับบริเวณส่วนปลายของสปอร์ (anterior end) ส่วนปลายสุดของสปอร์มี anchoring disc ลักษณะคล้ายดอกเห็ดและมีท่อเชื่อมต่อด้านล่าง (manubroid) ซึ่งท่อ polar filament จะขยายใหญ่ขึ้น ปรสิตชนิดนี้มี polar filament ขดเป็นเกลียว 8 รอบและเรียงตัวกันเป็นแถวเดียวที่ด้านท้ายของสปอร์ และภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจะเห็นแถบมืดสลับแถบสว่างอย่างชัดเจน โดย coil มีขนาด 0.55 ไมโครเมตร (0.19-1.06 ไมโครเมตร) (ภาพที่ 42,43 และ 44) ซึ่งท่อนี้มีหน้าที่ในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ท่อทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน โดยอาศัยการหดตัวของ polaroplast ในส่วนหน้าของสปอร์หรือเป็นช่องว่างท้ายลำตัว (posterior vacuole) ทำให้ท่อยาวที่ขดเป็นเกลียวของ polar filament ถูกดันออกเหมือนกับการกลับด้านถุงมือและปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ได้ (Lom and Dykova, 1992) โครงสร้างในระดับเซลล์ของปรสิตไมโครสปอริเดียสกุล *Thelohania* ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งมีการรายงานไว้โดย Vernick *et al.* (1977) และ Johnston *et al.* (1978) และ Hazard and Oldacre (1975) และ Clotilde-Ba and Togobauye (1994) รายงานเกี่ยวกับเซลล์สืบพันธุ์และระยะการแบ่งตัวของปรสิต *Agmasoma penaei* ในกุ้ง *P. sertiferus*

การศึกษาปรสิต *Thelohania* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปรสิตชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ Thelohaniidae ซึ่งมีสปอร์เดี่ยวๆ 8 สปอร์ที่เกิดจากการแบ่งตัวของ sporogonial plasmodium ภายใน pansporoblast (Tuzet *et al.*, 1971; Hazard and Oldacre, 1975; Sprague, 1977) บางการศึกษาใช้คำว่า sporophorous แทนคำว่า pansporoblast ที่มีสปอร์อยู่ในจำนวนที่จำเพาะของปรสิตแต่ละชนิด นอกจากนี้นักวิจัยบางกลุ่มจะไม่ใช่ sporophorous vesicle แต่จะใช้ sporophorous vacuole แทน (Azevedo and Canning, 1987; Sprague *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 2000) ซึ่งปรสิต *Thelohania (Agmasoma) penaei* สามารถแยกความแตกต่างออกจากปรสิตในสกุล *Thelohania* ได้จากจำนวน coil ของ polar filament และ cytoplasmic vacuoles ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับปรสิตในสกุล *Thelohania* ชนิดอื่นๆ เนื่องจากเป็นลักษณะทั่วไปในปรสิตกลุ่ม

ไมโครสปอริเดีย และส่วนใหญ่พบว่ามี electron-dense granules ที่เป็นร่างแหในการสร้าง polar filament (Weidner, 1970; Szolloski, 1971; Jensen and Wellingd, 1972; Walker and Hinsch, 1972)

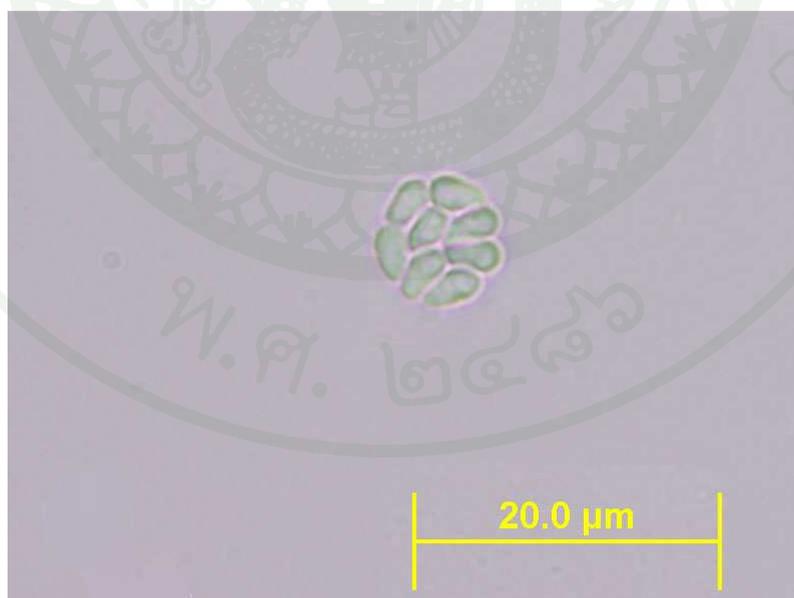
นอกจากนี้ Mercier (1909) ได้อธิบายวงจรชีวิตของ *Thelohania giardi* ว่ามีเซลล์สืบพันธุ์ขนาดเล็ก (isogamete) ที่มีนิวเคลียสเดียวซึ่งพบอยู่ในไซโทพลาสซึม หลังจากนั้นจึงรวมอยู่ในนิวเคลียส โดยเซลล์ที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วยนิวเคลียสอันเดียวซึ่งเซลล์สืบพันธุ์ (sporont) ค้นพบโดย Johnston *et al.* (1978) และกล่าวว่าเซลล์สืบพันธุ์มีนิวเคลียสเดียวอย่างชัดเจน หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นแบบ diplokaryotic cell ซึ่งสอดคล้องกับ Mercier (1909) ที่กล่าวว่ามีการรวมไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียว 2 เซลล์ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ไม่พบวงจรชีวิตรูปแบบนี้ มีการรายงานพบเซลล์สืบพันธุ์ (sporogony) ในปรสิตสกุล *Thelohania* (Henneguy and Thelohan, 1892) หลังจากนั้นมีการรายงานเพิ่มเติมมากขึ้น โดย Mercier (1909) มีการกล่าวอย่างชัดเจนว่า sporogony จะแบ่งออกเป็น 3 เซลล์ แต่ละเซลล์จะสมบูรณ์ก่อนที่จะพัฒนาต่อไป ลักษณะสำคัญของปรสิต *Thelohania* คือมีระยะ sporogonial plasmodium แต่อย่างไรก็ตาม Johnston *et al.* (1978) ซึ่งชี้ชัดว่าเป็นปรสิต *Thelohania* อย่างถูกต้องประกอบด้วย sporogony ที่ผ่านขั้นตอนการแบ่งตัวแบบ binary divisions 3 ครั้ง แต่ไม่มีระยะ sporogonial plasmodium



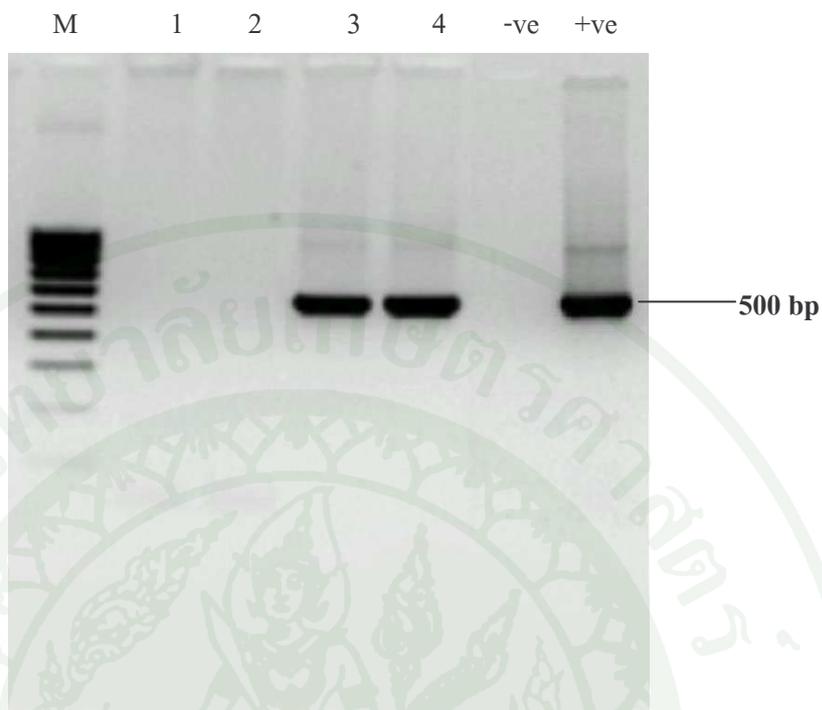
ภาพที่ 22 กุ้งขาวแวนนาไมติดเชื้อไมโครสปอริเดียในส่วนต่างๆ ของลำตัว



ภาพที่ 23 เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมีสีขาวคล้ายน้ำมันสามารถแยกออกจากกล้ามเนื้อได้



ภาพที่ 24 สปอร์สดของปรสิตไมโครสปอริเดียรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์อยู่ใน sporophorous vesicle (bar=20 μ M)



ภาพที่ 27 ผลการตรวจสอบชนิดของปรสิตไมโครสปอริเดียด้วยวิธีเทคนิคพีซีอาร์

M = molecular marker ขนาด 100 bp

1 = กุ้งขาวแวนนาไมปกติตัวอย่างที่ 1

2 = กุ้งขาวแวนนาไมปกติตัวอย่างที่ 2

3 = กุ้งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียตัวอย่างที่ 1

4 = กุ้งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียตัวอย่างที่ 2

-ve = ตัวอย่างควบคุมผลลบ

+ve = ตัวอย่างควบคุมผลบวก

Sample 1 1 -----AAA 3
T. penaei 1 GCCAGCAGCCGCGGTAATACCAACACCAAGAGTCTCTATGCGAGTTGCTGCAGTTAAAA 60

Sample 1 4 GTCCGTAGTCTATACGTAATTAATAAATGAATGA---TCAAGTTTCATATTTTACGTTT 59
T. penaei 61 GTCCGTAGTCTATACGTAATTAATAAATGAATGAATGATCAAGTTTCATATTTTACGTTT 119

Sample 1 60 ACATATGAGACGGATTGGGAGCATAGTATAACTGGGTTAAGAATGAAATCTCACTACCCT 119
T. penaei 120 ACATATGAGACGGATTGGGAGCATAGTATAACTGGGTTAAGAATGAAATCTCACTACCCT 179

Sample 1 120 AGTTGGACTATCAGAAGCGAAAGCGATGCTCTAATACGTAAGTTTATAGATAAAGGACGAG 179
T. penaei 180 AGTTGGACTATCAGAAGCGAAAGCGATGCTCTAATACGTAAGTTTATAGATAAAGGACGAG 238

Sample 1 180 GCTAGAGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTTCTAAGCAGTAAACTATGCCGACAG 239
T. penaei 239 CTAAAGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTTCTAAGCAGTAAACTATGCCGACAG 298

Sample 1 240 AATGTTAGATCTTTTCTAGTGTCAAGGAAACCTTAACTGATCGGGCTCTGGGGAGAG 299
T. penaei 299 AATGTTAGATCTTTTCTAGTGTCAAGGAAACCTTAACTGATCGGGCTCTGGGGAGAG 354

Sample 1 300 TATGCTCGCAAGTGTGAAAATTAAACGAAATTGACGGAGTTACACCACAAGGAGTGGATT 359
T. penaei 355 TATGCTCGCAAGTGTGAAAATTAAACGAAATTGACGGAGTTACACCACAAGGAGTGGATT 412

Sample 1 360 GTGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGAGGAATTTTATAGGGCTGAATATATTTGAGATTG 419
T. penaei 413 TTGCTGCTTAATTTGACTCAACGCGAGGAATTTTATAGGGCTGAATATATTTGAGATTG 472

Sample 1 420 ACTACATGAAATATATTTGAGTGGTGCATGGTGGTTGTAACCCATGGATT----- 470
T. penaei 473 ACTACATGAAATATATTTGAGTGGTGCATGGTGGTTGTAACCCATGGATTGATCTTAAG 532

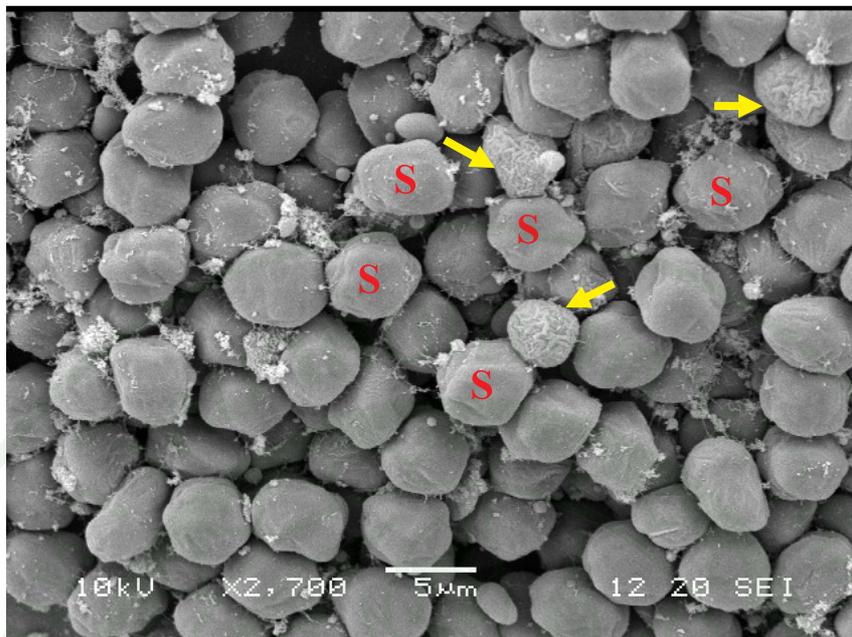
Sample 1 470 ----- 470
T. penaei 533 TTCAACAGCTAAAAATGGGTGAGACTTTCATAAACAGCTATCTAACAGGTAGAGGAGGGG 592

Sample 1 470 ----- 470
T. penaei 593 AAGGCGATAACAGATCCGTGATGCCCTCAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCAATACATTAT 652

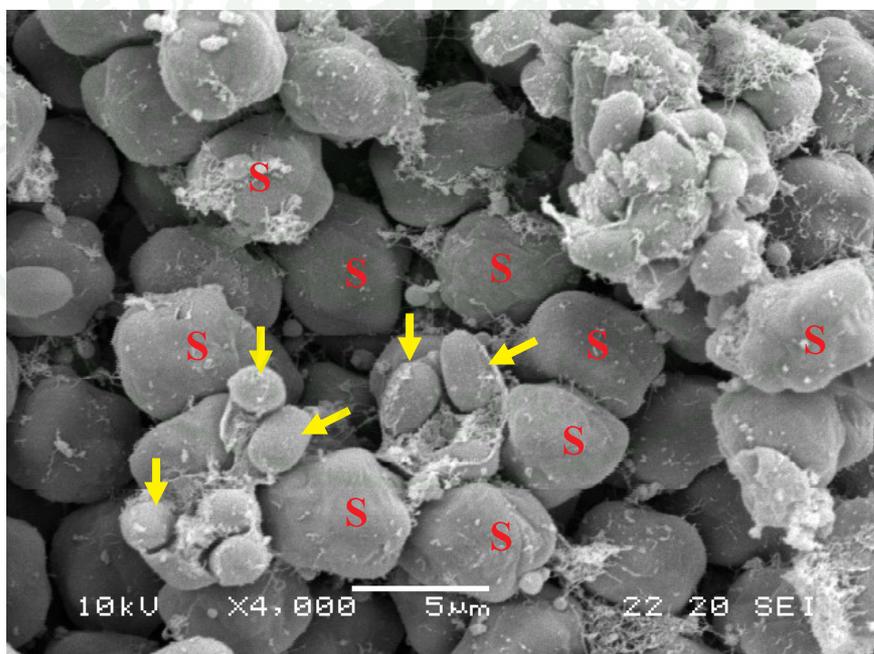
Sample 1 470 ----- 470
T. penaei 653 GTATAATTTTTATATATAAATACTACATATTGGGGGATTGACTTTTGTAAATAAGTCATG 712

Sample 1 470 ----- 470
T. penaei 713 AACTTGG 719

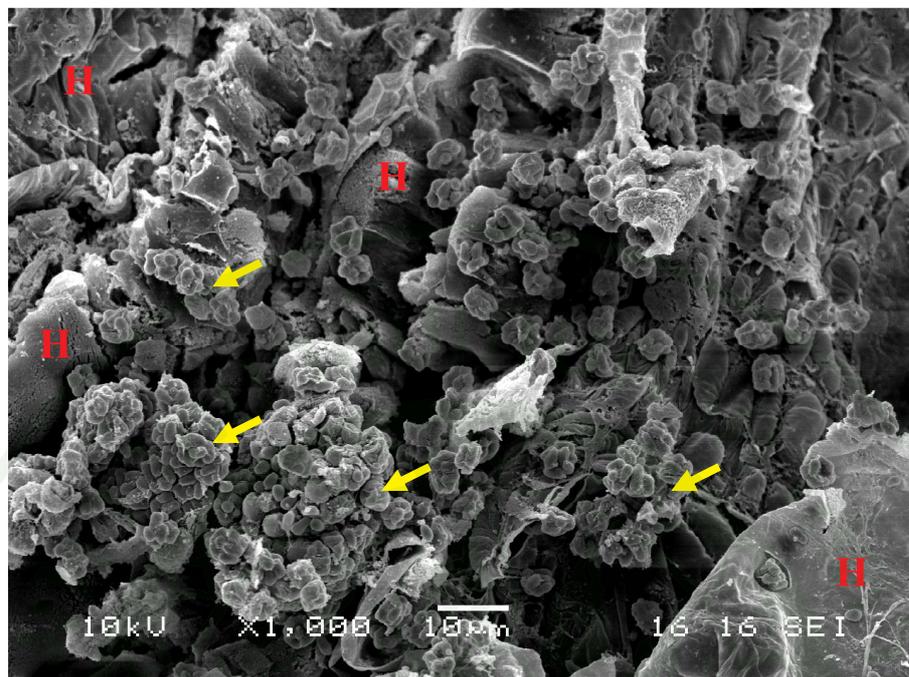
ภาพที่ 28 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR ขนาด 500 bp เปรียบเทียบกับจีโนมของ
 ปรสิต *T. penaei* ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไมจากการศึกษาครั้งนี้



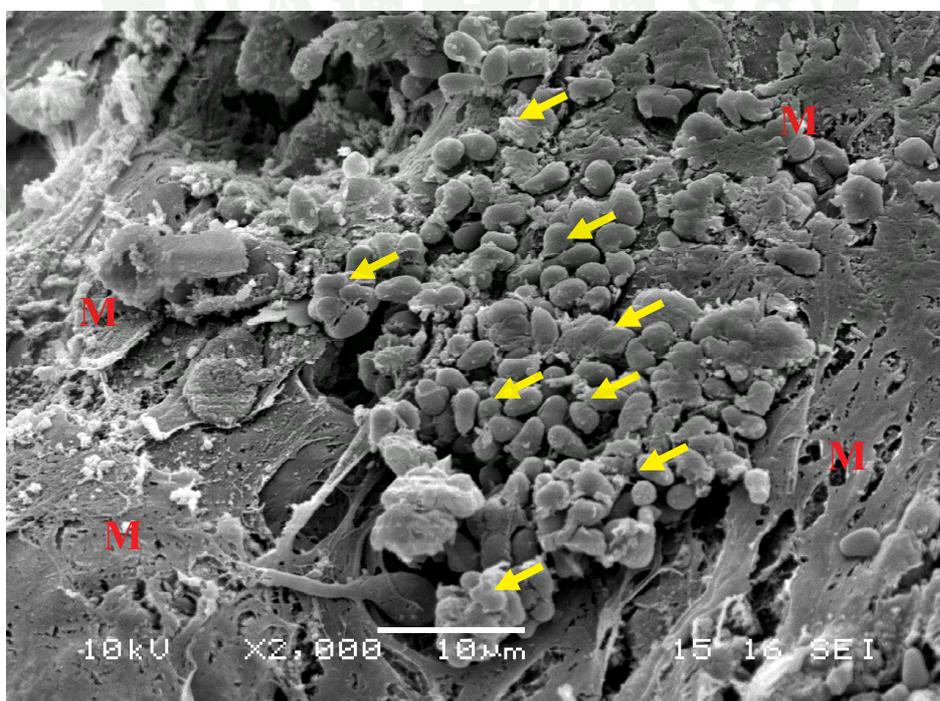
ภาพที่ 29 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด sporophorous vesicle (S) ที่มีขนาดต่างๆ กัน ขนาดเล็กเป็นระยะ sporont (ครี) (bar= 5 μM)



ภาพที่ 30 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดภายใน sporophorous vesicle (S) ประกอบด้วยสปอร์เดี่ยวๆ (ครี) อยู่ภายใน (bar= 5 μM)



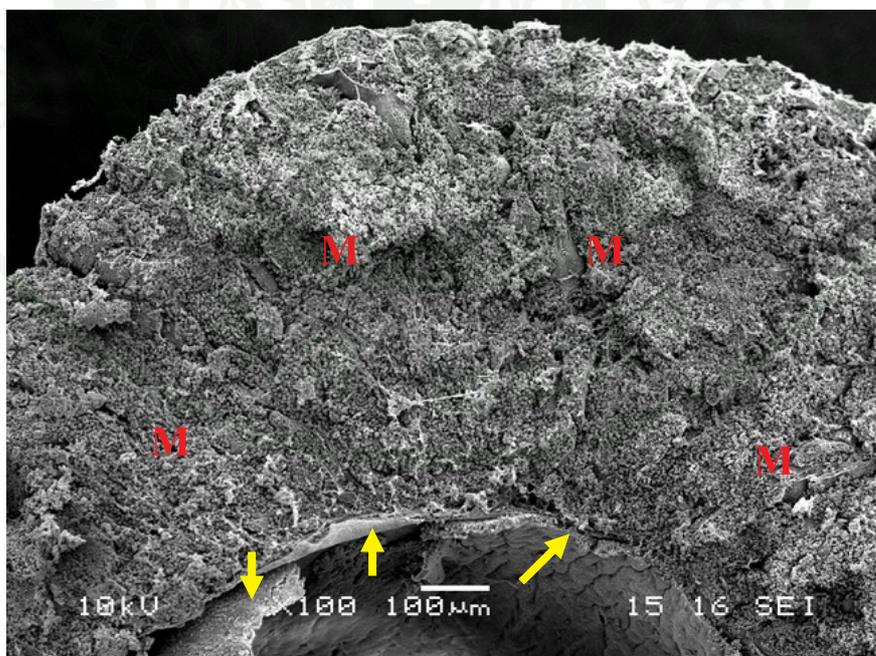
ภาพที่ 31 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดบริเวณที่ปรสิต์ *T. penaei* (สรชี้) แทรกอยู่ในเซลล์ตับและตับอ่อน (H) (bar=10 µM)



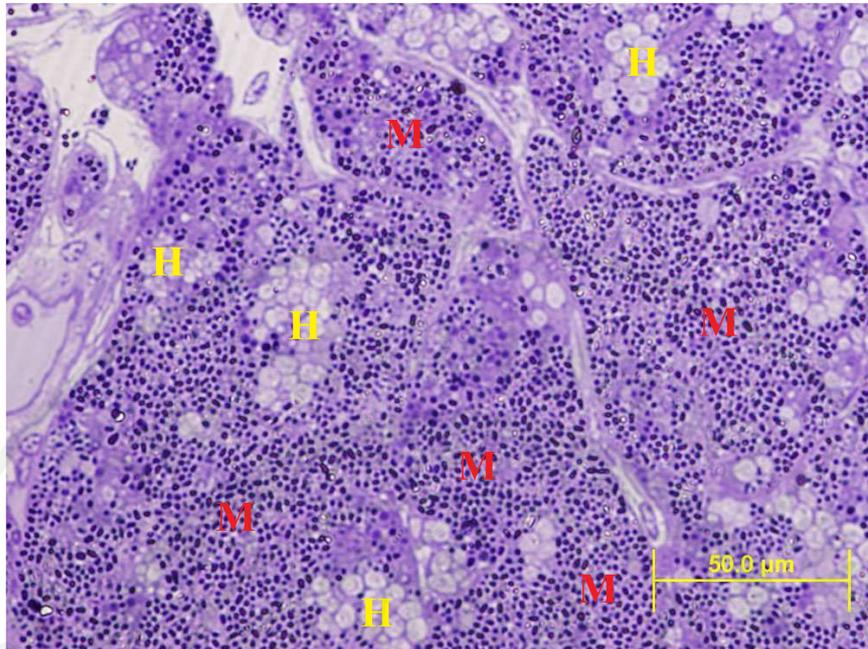
ภาพที่ 32 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงบริเวณกล้ามเนื้อ (M) ที่มี ปรสิต์ *T. penaei* (สรชี้) แทรก (bar=10 µM)



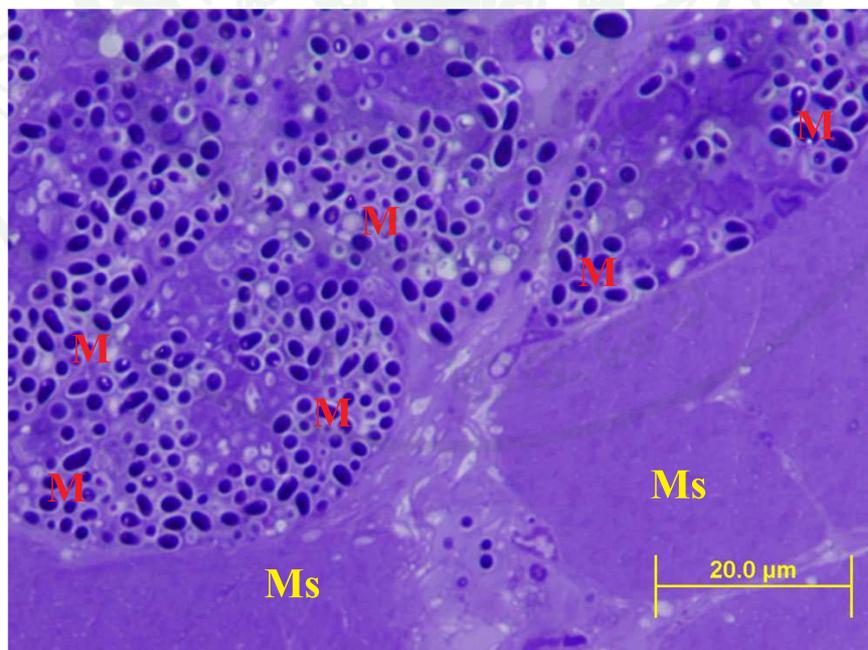
ภาพที่ 33 ลำไส้กุ้งขาวที่ติดเชื้อถูกล้อมด้วยเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นของปรสิตไมโครสปอริเดีย



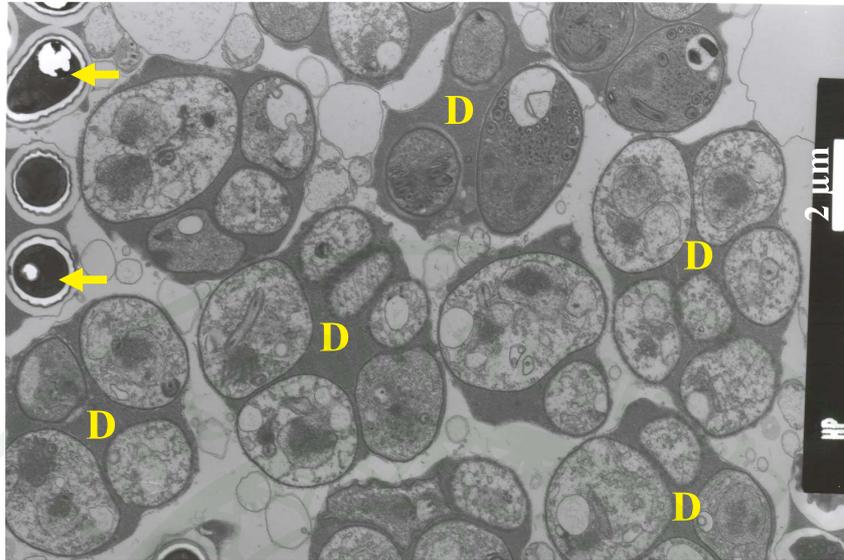
ภาพที่ 34 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดบริเวณลำไส้ (ศรีจี) ที่มีปรสิต *T. penaei* (M) จำนวนมากห่อหุ้ม (bar=500 µM)



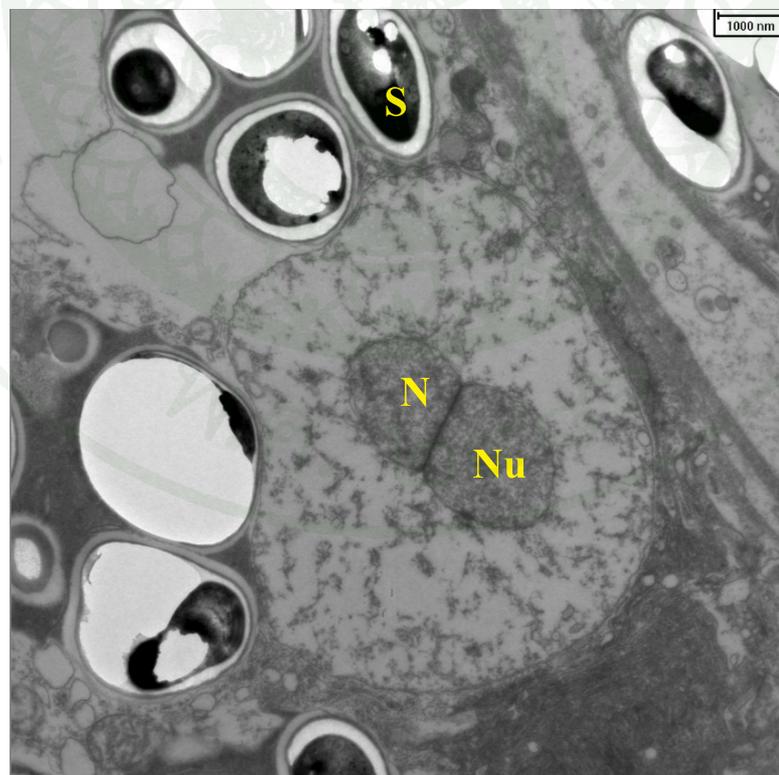
ภาพที่ 35 semithin section ของตับและตับอ่อนของกึ่งขาว (H) ที่แทรกด้วยปรสิตไมโครสปอริเดีย (M) แทรกเป็นจำนวนมาก (bar=50 μM)



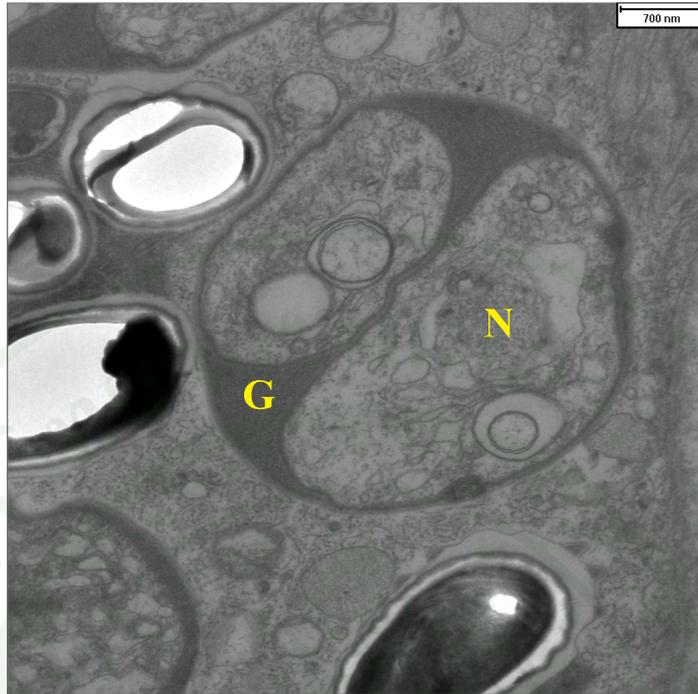
ภาพที่ 36 semithin section ของกล้ามเนื้อของกึ่งขาว (Ms) ที่ถูกแทรกด้วยปรสิตไมโครสปอริเดีย (M) (bar=20 μM)



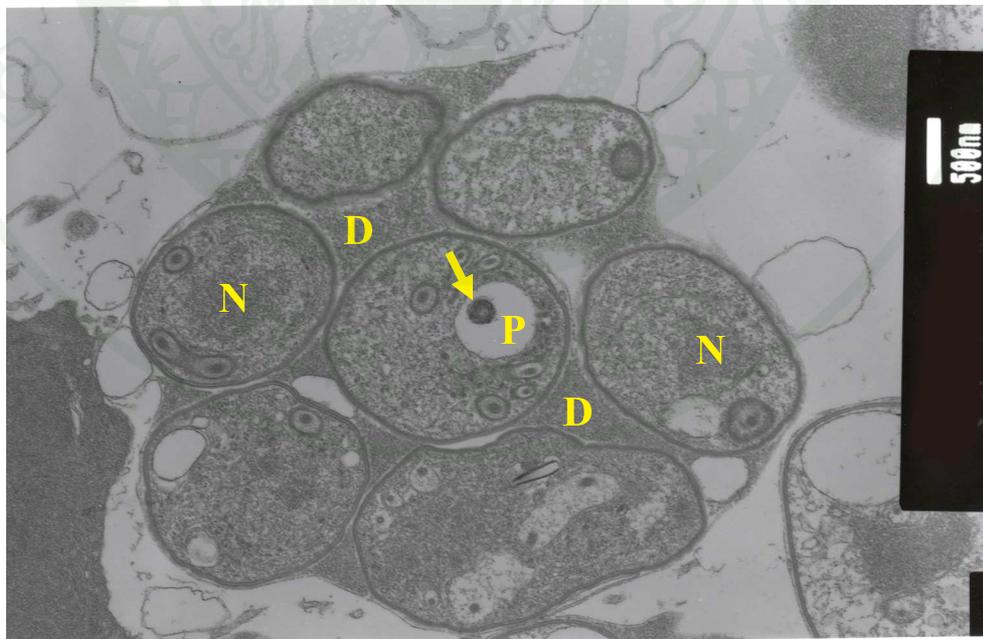
ภาพที่ 37 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงระยะต่างๆ ของสปอร์ *T. penaei* ในกึ่งขาวแวนนาไม ระยะสปอร์ที่พัฒนาสมบูรณ์แล้ว (mature spore) (สรชี้) และสปอร์ที่อยู่ในระยะแบ่งตัว (developmental stage) (D)



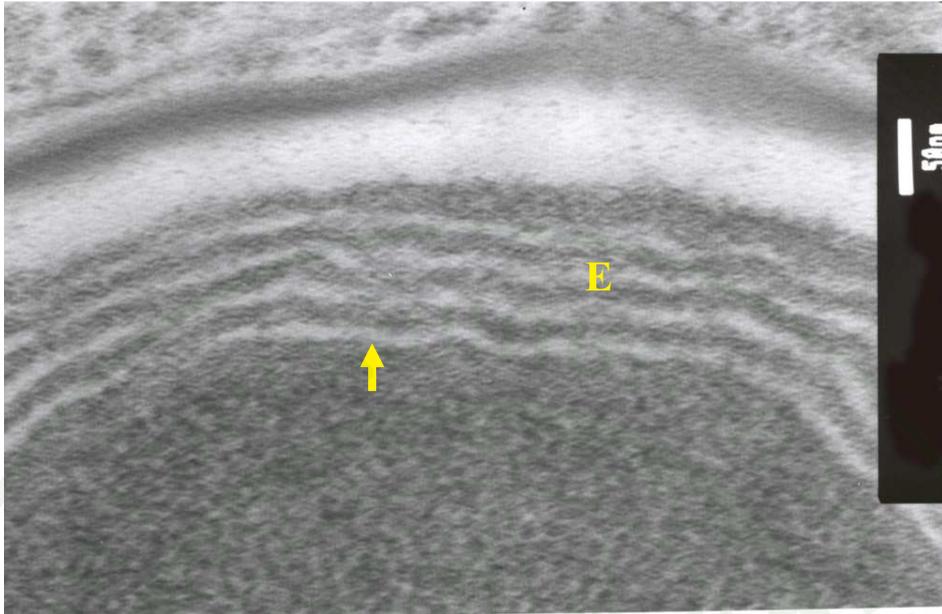
ภาพที่ 38 ปรสิต *T. penaei* ระยะ merogony ที่มีนิวเคลียส (N) และนิวคลีโอลัส (Nu) ที่มีด้านใดด้านหนึ่งติดกันแบบ diplokaryotic และสปอร์ในระยะพัฒนาสมบูรณ์ (S)



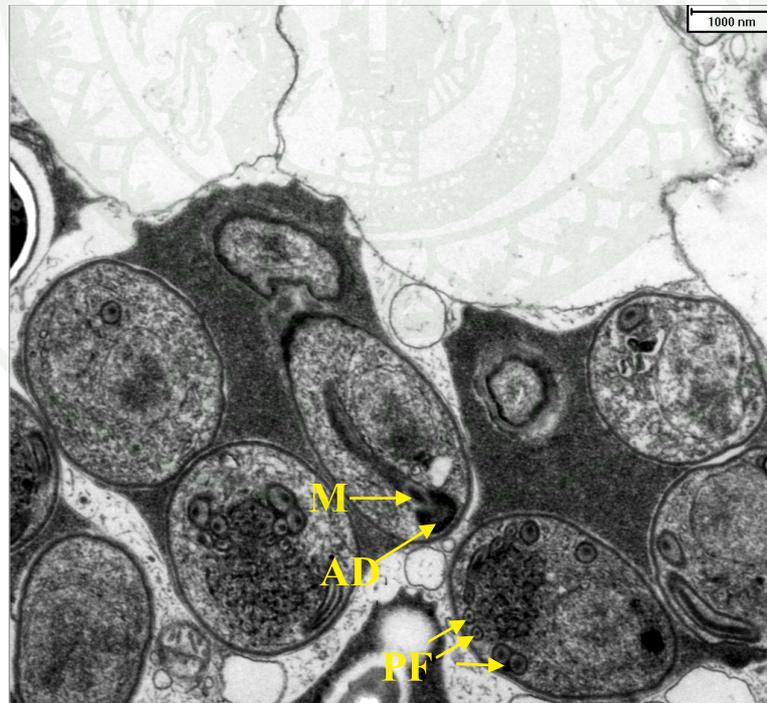
ภาพที่ 39 การแบ่งตัวของปรสิต *T. penaei* ระยะ binary fission ที่มีนิวเคลียส (N) อันเดียวชัดเจน และในระยษนี้มีการเกิด granular ขนาดเล็ก (G)



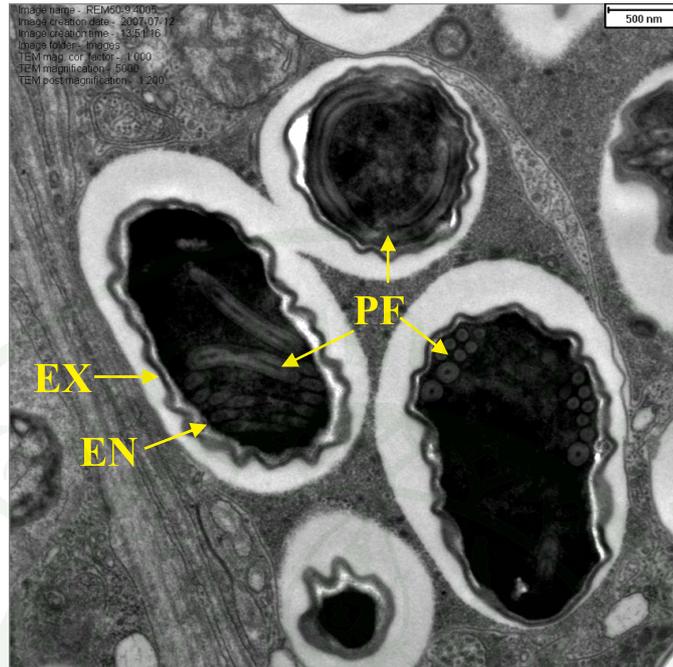
ภาพที่ 40 การแบ่งตัวระยะสุดท้ายของปรสิต *T. penaei* เกิด sporont ที่แบ่งตัวจนเป็นสปอร์เดี่ยว 8 สปอร์ (ภาพนี้แสดงตัดผ่านได้เพียง 7 สปอร์) แต่ละสปอร์ล้อมรอบด้วย granular ขนาดเล็ก (D) มีนิวเคลียส (N) และ posterior vacuole (P) และ postersome (สรชี)



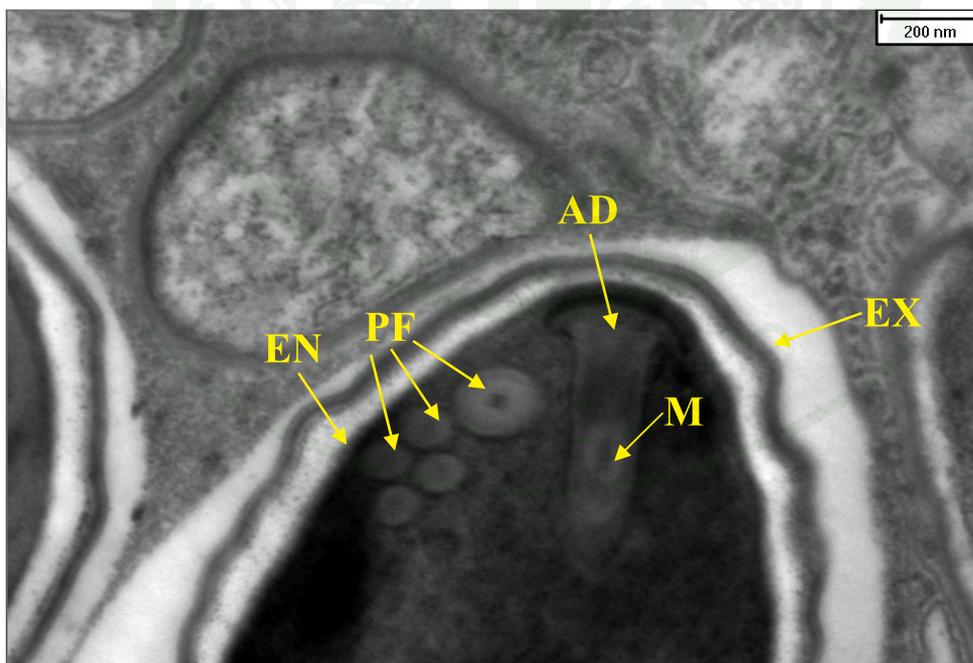
ภาพที่ 41 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงให้เห็น exospore (E) และ endospore (สรชี) ซึ่ง exospore มีลักษณะแถบมืดสลับกับแถบสว่าง



ภาพที่ 42 แสดงส่วนปลายสุดของสปอร์มี anchoring disc (AD) มีลักษณะคล้ายดอกเห็ด และมีท่อเชื่อมต่อด้านล่าง (manubroid) (M)



ภาพที่ 43 ภาพตัดตามยาวของสปอร์แสดงให้เห็นผนังเซลล์สองชั้นอย่างชัดเจน endospore (EN) และ exospore (EX) และรวมทั้ง polar filament (PF)



ภาพที่ 44 ภาพตัดตามยาวของสปอร์แสดงให้เห็น anchoring disc (AD) มีลักษณะคล้ายดอกเห็ดและมีท่อเชื่อมต่อด้านล่าง (manubroid) (M) และมี polar filament (PF) รวมทั้งผนังเซลล์สองชั้นอย่างชัดเจน endospore (EN) และ exospore (EX)

3. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกึ่งขาวเวนนานาไมที่ติดเชื้อ ไมโครสปอริเดีย

กึ่งขาวเวนนานาไมเริ่มพบว่าการติดเชื้อไมโครสปอริเดียหลังจากเลี้ยงนาน 20-30 วัน ความรุนแรงของการติดเชื้อจะแตกต่างกัน กึ่งที่ติดเชื้อปรสิติ ไมโครสปอริเดียรุนแรงโดยลักษณะภายนอกสังเกตเห็นเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นแทรกอยู่ตั้งแต่ส่วนหัวตลอดจนส่วนอื่น ๆ บนลำตัว (ภาพที่ 45) และเมื่อผ่าดูภายในพบว่า มีปรสิติ ไมโครสปอริเดียแทรกอยู่ในอวัยวะต่างและอวัยวะอื่น ๆ โดยรอบทั้งกระเพาะอาหาร และกล้ามเนื้อลำตัว (ภาพที่ 46) ส่วนกึ่งในกลุ่มที่มีการติดเชื้อไม่รุนแรงลักษณะภายนอกพบว่ามีเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นแทรกเฉพาะในส่วนที่เป็นกล้ามเนื้อลำตัว (ภาพที่ 47) และเมื่อผ่าดูภายในพบว่า มีปรสิติ ไมโครสปอริเดียแทรกอยู่เฉพาะในกล้ามเนื้อลำตัวบางส่วนเท่านั้น (ภาพที่ 48) หลังจากเลี้ยงกึ่งเป็นระยะเวลา 45 วันเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีกึ่งติดเชื้อในระดับความรุนแรงคล้ายกับที่ 30 วันแต่กึ่งมีขนาดโตกว่าจึงสามารถมองเห็นจากภายนอกได้ชัดเจนขึ้น

ทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกึ่งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียรุนแรงมีปรสิติแทรกอยู่ในตับ และตับอ่อนแทนที่อวัยวะเกือบทั้งหมด (ภาพที่ 49) ทำให้เซลล์ตับและตับอ่อนฝ่อและเสื่อมลงจำนวนมาก (ภาพที่ 50) และกึ่งบางตัวเซลล์บุตับและตับอ่อนเสื่อม จนไม่เห็นเซลล์ที่มีรูปร่างปกติเหลืออยู่เลย (ภาพที่ 51) โดยเฉพาะ R-cell มีจำนวนน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกึ่งปกติ (ภาพที่ 52) เนื่องจากตับและตับอ่อนเป็นอวัยวะสำคัญเกี่ยวกับการหลั่งเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ช่วยในการย่อยอาหารและการเก็บสะสมสารอาหารต่างๆ โดยเฉพาะ R-cell ดังนั้นกึ่งที่มีการติดเชื้อรุนแรงมีปรสิติแทรกในตับและตับอ่อนมากจึงมีการเจริญเติบโตต่ำกว่ากึ่งที่ติดเชื้อเฉพาะในกล้ามเนื้อลำตัวเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบกลุ่มของไมโครสปอริเดียแทรกอยู่เป็นจำนวนมากในอวัยวะสำคัญอื่นๆ ได้แก่ กระเพาะอาหาร (ภาพที่ 53) ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) (ภาพที่ 54) หัวใจ (ภาพที่ 55) เหงือก (ภาพที่ 56) กล้ามเนื้อลำตัว (ภาพที่ 57 และ 58) รอบๆ ต่อมเมือก (tegmental gland) (ภาพที่ 59) เซลล์ประสาท (ภาพที่ 60) และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) (ภาพที่ 61) ซึ่งอวัยวะหรือต่อมต่างๆ ที่มีไมโครสปอริเดียแทรกอยู่เหล่านี้ส่วนใหญ่จะไม่มีอาการเกิดลักษณะผิดปกติจากการตอบสนองของเซลล์ ยกเว้นในตับและตับอ่อนที่มี granuloma จากกึ่งที่ติดเชื้อไม่กี่ตัว (ภาพที่ 62) และกล้ามเนื้อลำตัวมีการเกิดการอักเสบเล็กน้อยคือ มีเม็ดเลือดเป็นจำนวนมากในบริเวณที่มีไมโครสปอริเดียแทรกอยู่ (ภาพที่ 63) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาจะไม่ค่อยพบการอักเสบในบริเวณที่มีปรสิติชนิดนี้ในเนื้อเยื่อ Lightner (1996) กล่าวว่า การติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกล้ามเนื้อของกึ่ง จะไม่ทำให้เกิดการอักเสบในบริเวณนั้น และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกึ่งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียที่ระยะเวลาการเลี้ยงมากขึ้น คือที่ 60, 75, 90, 105 และ 120 วัน พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อคล้ายกับที่ระยะเวลาการเลี้ยง 45 วัน ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็น

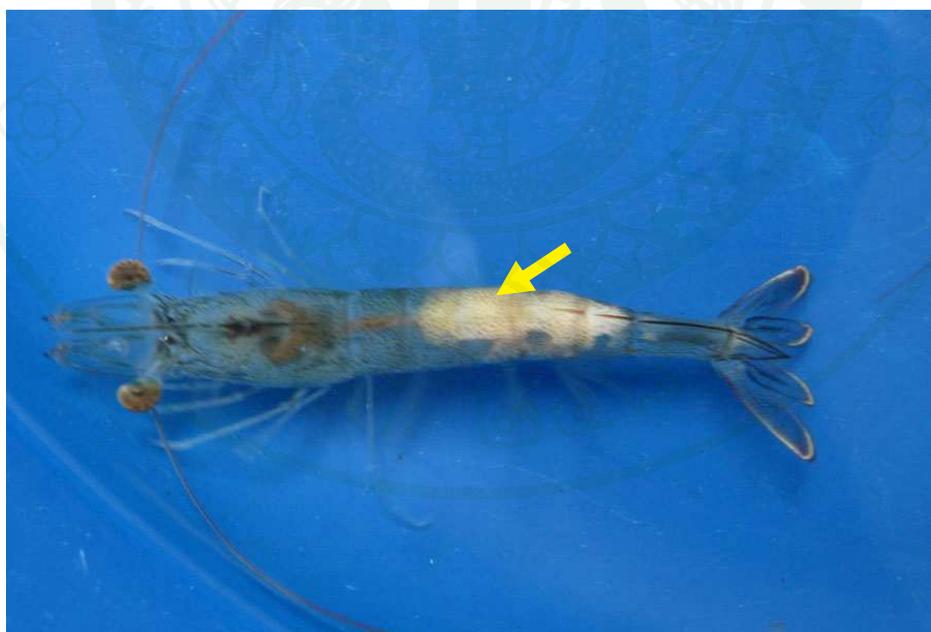
ว่ากุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงบางส่วนจะทยอยตายหลังจาก 60 วัน เนื่องจากเมื่อคุณจากการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจะพบว่าอวัยวะสำคัญต่างๆ เสื่อมสภาพและถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดียเกือบทั้งหมด ทำให้การทำหน้าที่ต่างๆ ของอวัยวะเหล่านี้ลดลงจนถึงระดับที่กุ้งอ่อนแอและตายในที่สุด ซึ่งจะพบว่ามีกุ้งที่ติดเชื้อที่ตายลอยอยู่บริเวณผิวน้ำในบ่อเลี้ยงด้วย (ภาพที่ 21) หรือกุ้งป่วยและอ่อนแอบางส่วนจะถูกกุ้งปกติกิน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียในครั้งนี้มีผลสอดคล้องกับการศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียของกุ้งกุลาดำในประเทศมาเลเซีย (Anderson *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย *Agmasoma penaei* ในเลือด หัวใจ อวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) เหงือก ตับและตับอ่อน ภาวะอาหาร และกล้ามเนื้อของกุ้งขาว *P. setiferus* (Rigdon *et al.*, 1975; Kelly, 1979) นอกจากนี้ Kelly (1979) รายงานว่าแม่พันธุ์ที่จับตามธรรมชาติและมีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย *A. penaei* จะเป็นหมันเพราะรังไข่ถูกทำลาย สำหรับไมโครสปอริเดียชนิดอื่น เช่น *Ameson nelsoni*, *Nosema sp.*, *Thelohania duorara* และ *Thelohania sp.* จะแทรกตัวเข้าไปเฉพาะในส่วนของกล้ามเนื้อลายเท่านั้น ส่วน *Pleistophora sp.* การติดเชื้อจะไม่ทำให้กล้ามเนื้อถูกย่อยสลายหรือถูกทำลายเป็นบริเวณกว้าง



ภาพที่ 45 กุ้งขาวแวนนาไมอายุ 30 วัน ที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย มีเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นของปรสิตไมโครสปอริเดียในส่วนต่างๆ ของลำตัว (สรชี)



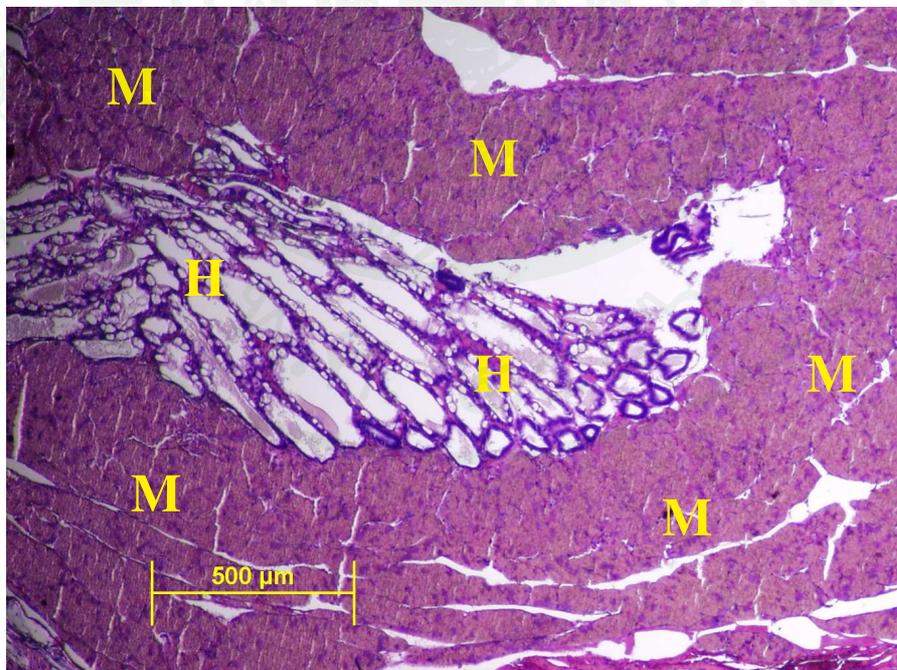
ภาพที่ 46 ลักษณะภายในลำตัวของกุ้งขาวแวนนาไมอายุ 30 วันที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียอย่างรุนแรง มีเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย (ศรีจี)



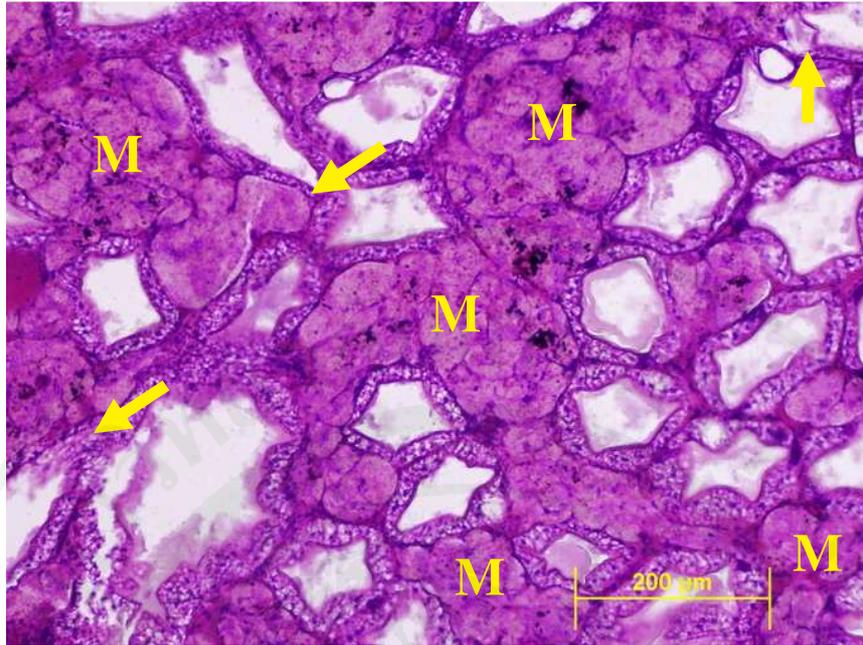
ภาพที่ 47 กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียเฉพาะบางส่วนของกล้ามเนื้อลำตัวเท่านั้น (ศรีจี)



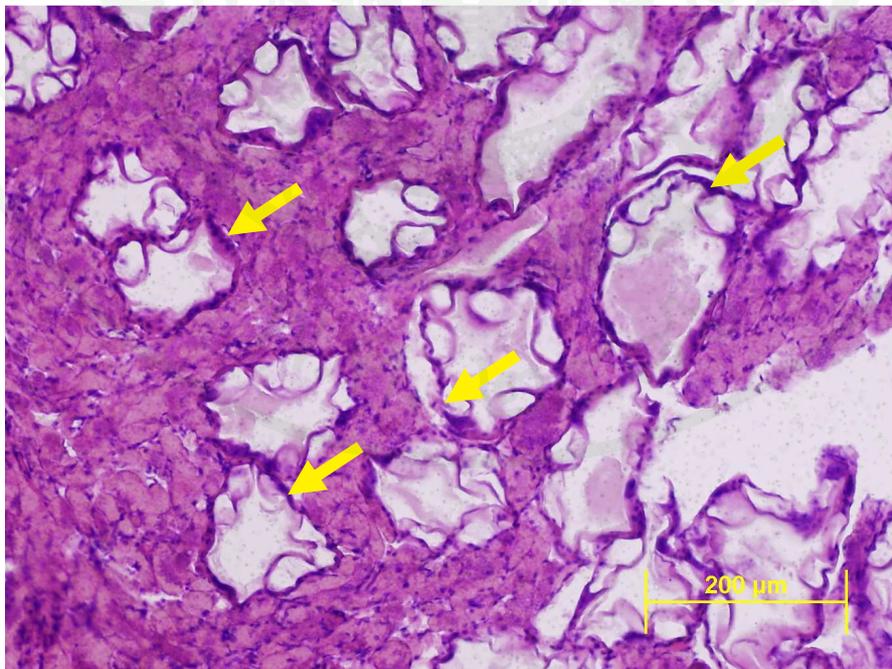
ภาพที่ 48 ลักษณะภายในของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะมีสีขาวขุ่นแทนที่ส่วนของกล้ามเนื้อบางส่วน (สรชี)



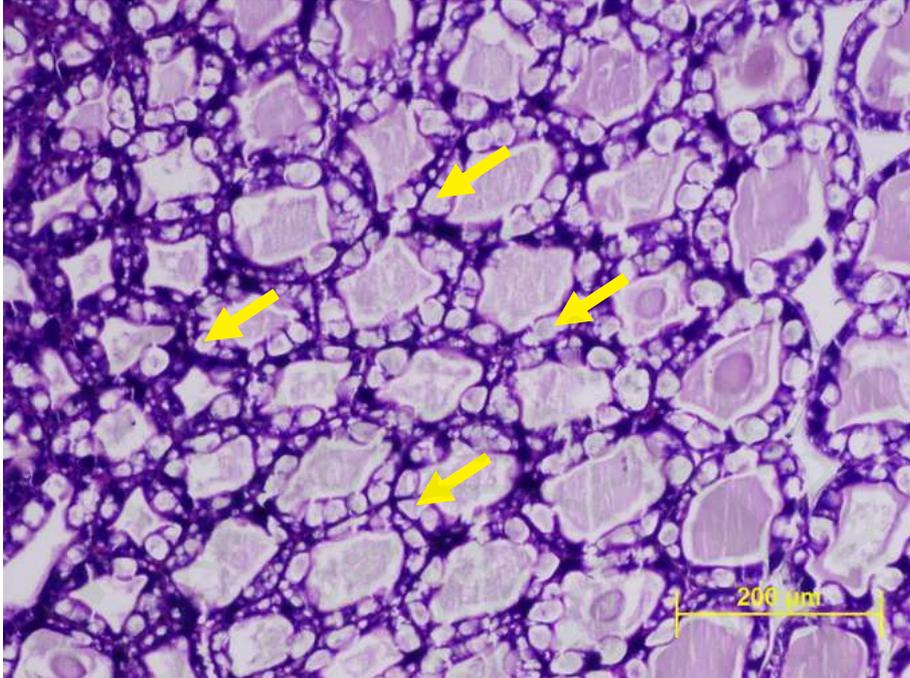
ภาพที่ 49 ดับและดับอ่อน (H) ของกุ้งขาวแวนนาไมถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดีย (M) จำนวนมาก (H&E, bar=500 μ M)



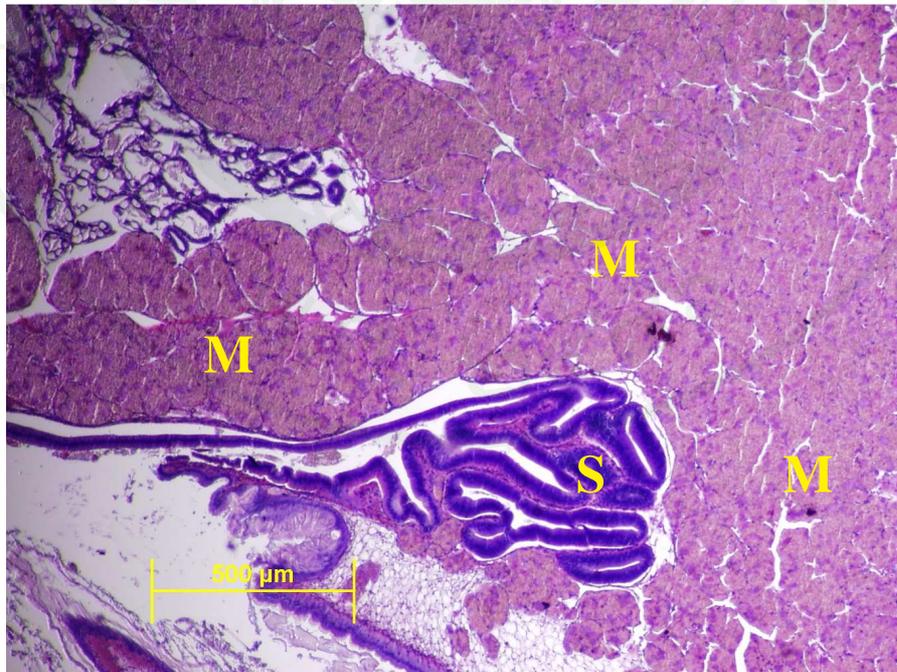
ภาพที่ 50 ผลิตไมโครสปอริเดียม (M) แทรกในต้นและต้นอ่อน ทำให้เซลล์บุท่อต้นและต้นอ่อนเสื่อมสภาพ (สรชี้) (H&E, bar = 200 μM)



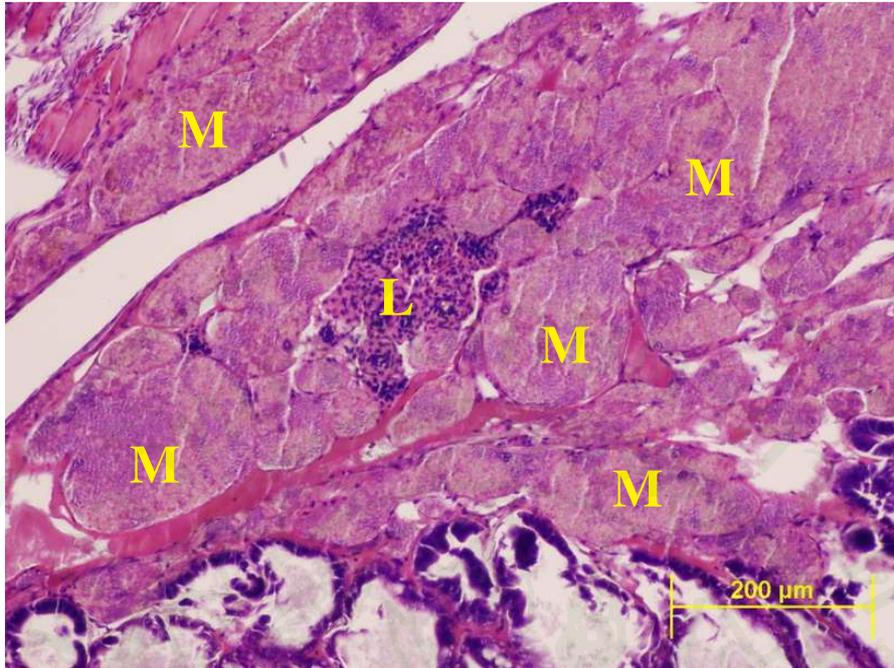
ภาพที่ 51 เซลล์บุท่อต้นและต้นอ่อนของกิ่งขาที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมมีรูปร่างผิดปกติ (สรชี้) (H&E, bar = 200 μM)



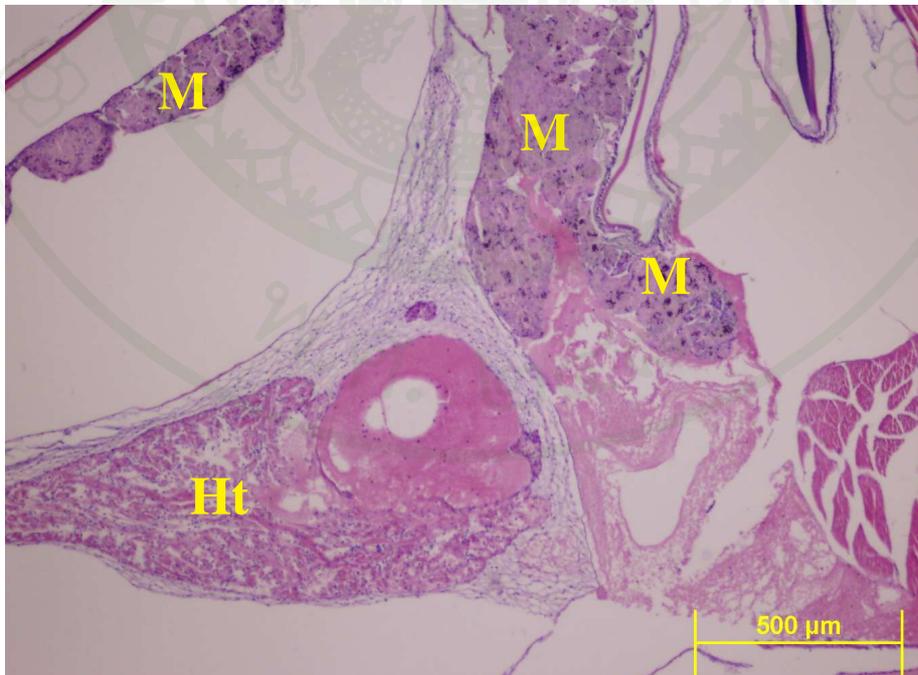
ภาพที่ 52 ลักษณะของเซลล์บุท่อตับและตับอ่อนของกึ่งขาวแว่นนาไมปกติที่มี R- cell สำหรับเก็บสะสมอาหารจำนวนมาก (ศรีชี) (H&E, bar = 200



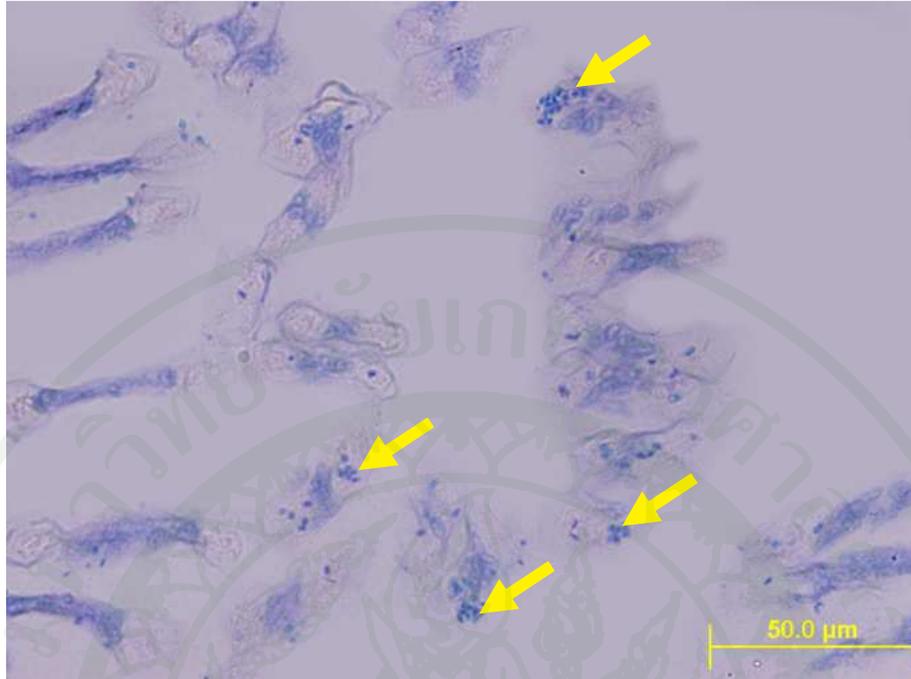
ภาพที่ 53 กระเพาะอาหาร (S) ของกึ่งที่ติดเชื้อจะถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดียจำนวนมาก (M) (H&E, bar=500 μM)



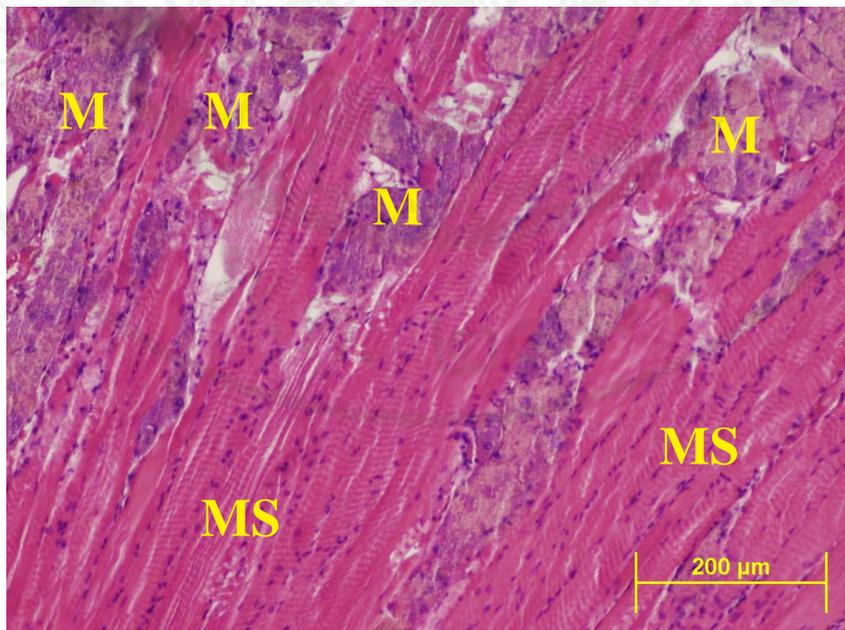
ภาพที่ 54 ต่อม้ำเหลือง (L) ของกุ่มที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะถูกแทนที่ด้วยปรสิตจำนวนมาก (M) (H&E, bar=200 μM)



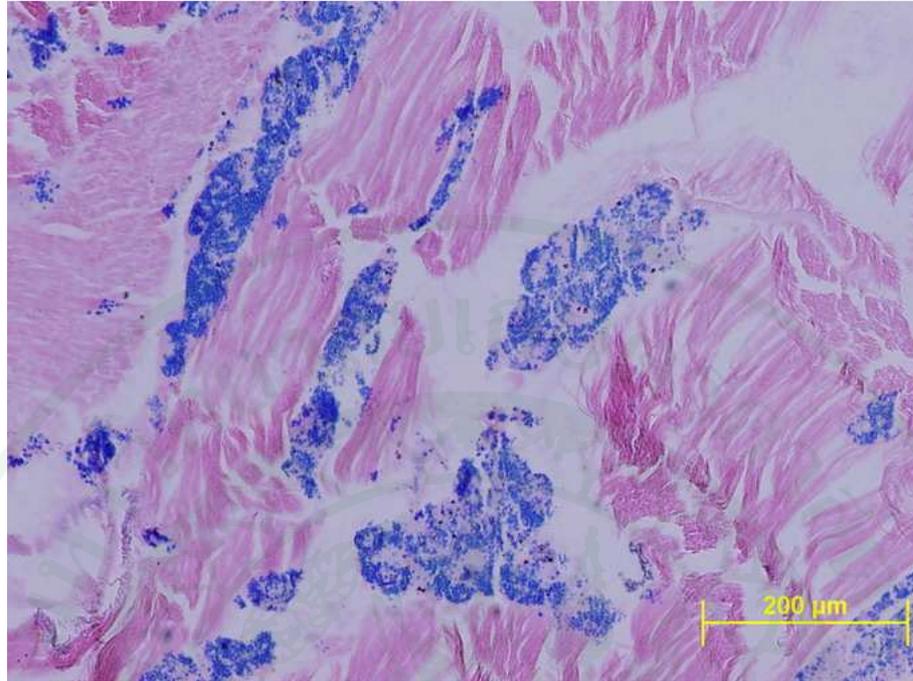
ภาพที่ 55 หัวใจ (Ht) ของกุ่มที่ติดเชื้อจะถูกแทรกด้วยไมโครสปอริเดีย (M) (H&E, bar=500 μM)



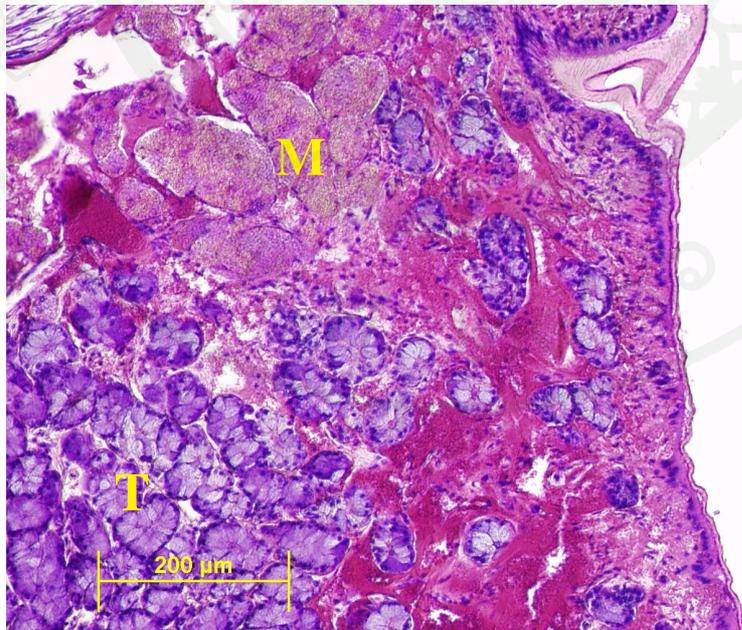
ภาพที่ 56 เหงือกของกิ้งที่ติดเชื้อจะถูกแทรกด้วยไมโครสปอริเดีย (สรชี้)
(Giemsa, bar=50 μM)



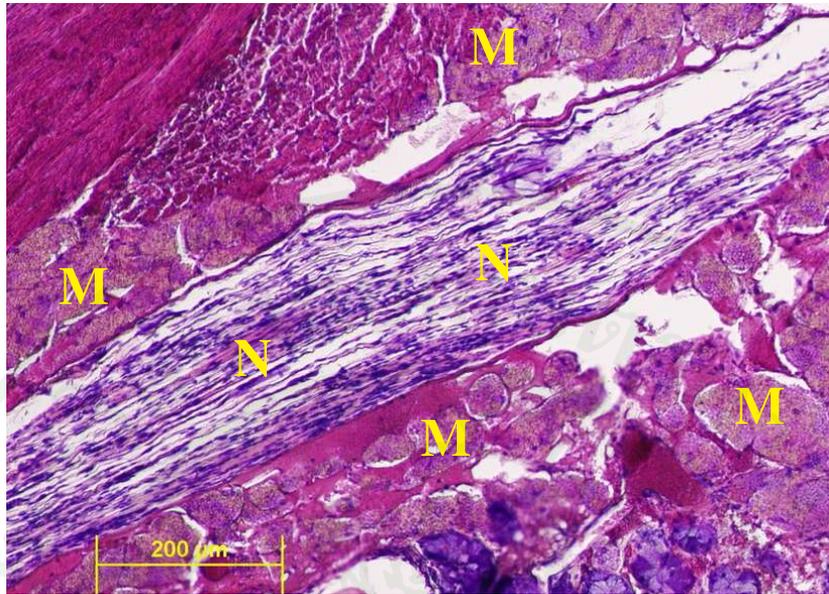
ภาพที่ 57 กล้ามเนื้อ (MS) บริเวณลำตัวบางส่วนของกิ้งที่ติดเชื้อถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดีย (M) (H&E, bar=200 μM)



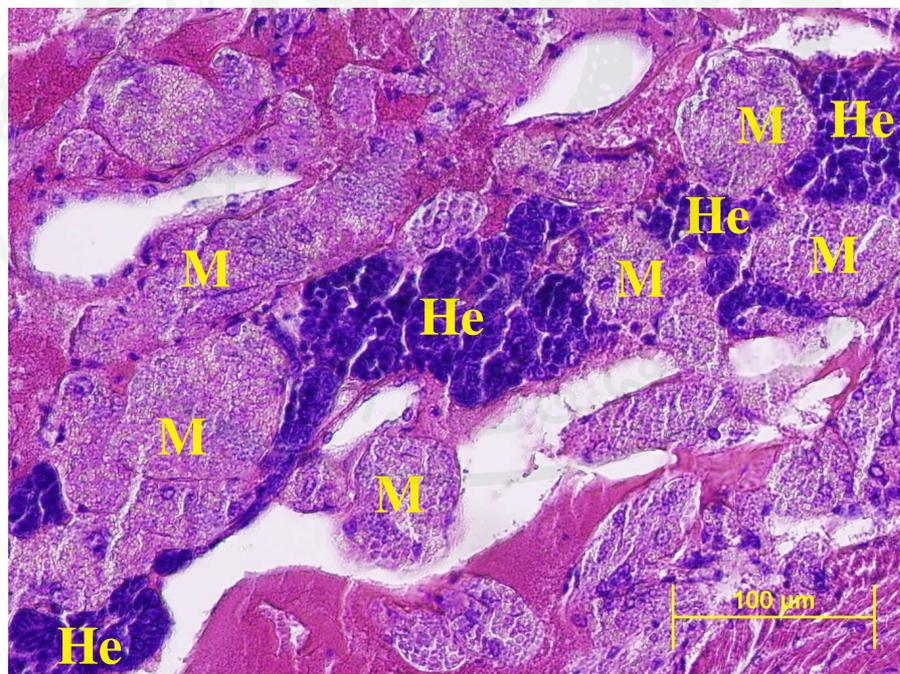
ภาพที่ 58 กล้ามเนื้อบริเวณลำตัว (ติดสีชมพู) บางส่วนของกึ่งที่ติดเชื้อถูกแทนที่ด้วยไมโครสปอริเดีย (ติดสีน้ำเงิน) (Giemsa, bar=200 μ M)



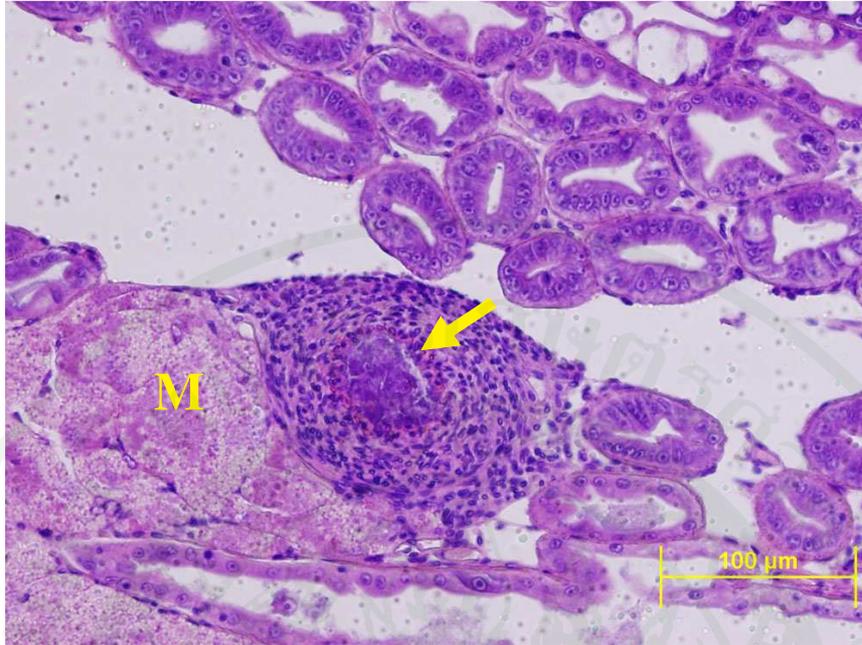
ภาพที่ 59 ต่อมเมือก (T) บางส่วนของกึ่งที่ติดเชื้อจะมีปรสิตไมโครสปอริเดียแทรก (M) (H&E, bar=200 μ M)



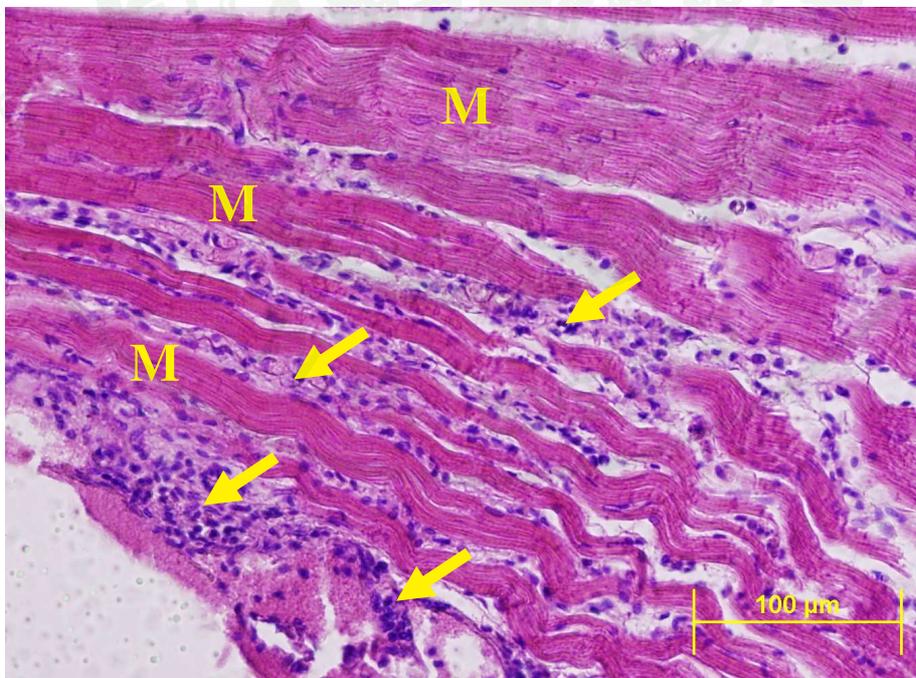
ภาพที่ 60 พยาธิสภาพของเซลล์ประสาท (N) ของกึ่งที่ติดเชื้อจะพบปรสิตไมโครสปอริเดียแทรกอยู่จำนวนมาก (M) (H&E, bar=200 μ M)



ภาพที่ 61 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (He) ของกึ่งที่ติดเชื้อจะพบปรสิตไมโครสปอริเดียแทรกอยู่จำนวนมาก (M) (H&E, bar=200 μ M)



ภาพที่ 62 ลักษณะ granuloma (ครชี้) ที่พบในตับและตับอ่อน (ครชี้) ของกิ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (M) (H&E, bar=100 μM)



ภาพที่ 63 บริเวณกล้ามเนื้อลำตัวของกิ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียบางส่วนมีการอักเสบ (ครชี้) สังกัดจากมีเซลล์เม็ดเลือดจำนวนมาก (H&E, bar=100 μM)

4. การศึกษาผลของความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาผลของความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชนในพื้นที่อำเภอทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยสุ่มตัวอย่างกุ้งด้วยแหเมื่อกุ้งอายุ 45 วันและหลังจากนั้นทุก 15 วัน และนำตัวอย่างกุ้งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียทั้งในตับและตับอ่อนและในกล้ามเนื้อลำตัว กลุ่มที่ 2 กุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียเฉพาะในส่วนของกล้ามเนื้อลำตัว และกลุ่มที่ 3 กุ้งปกติที่ไม่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (ภาพที่ 7) หลังจากนั้นนำตัวอย่างกุ้งแต่ละกลุ่มมาชั่งน้ำหนัก เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกุ้งแต่ละกลุ่ม พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในระดับความรุนแรงที่ต่างกันทั้ง 3 กลุ่มจะแตกต่างกันตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 120 วันในทั้ง 3 บ่อ ดังตารางที่ 3-5 โดยกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียในตับและตับอ่อนและบริเวณกล้ามเนื้อลำตัวมีน้ำหนักกุ้งน้อยกว่ากุ้งที่ติดเชื้อในกล้ามเนื้อลำตัวอย่างเดียวและกุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

โดยกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียส่วนของลำตัวอย่างเดียวมีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยกว่ากุ้งปกติที่ไม่ติดเชื้อแต่มีน้ำหนักมากกว่ากุ้งกลุ่มที่มีการติดเชื้อทั้งในตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัว (ภาพที่ 64) และกุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียทั้งในตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัวพบว่ากุ้งจะมีลักษณะลำตัวพอมและเปลือกกุ้งนึ่มกว่ากุ้งที่ติดเชื้อกลุ่มอื่นและกุ้งปกติอย่างชัดเจน (ภาพที่ 65) ซึ่งกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียในลักษณะดังกล่าวจะอ่อนแอมากและเมื่อผ่าดูภายในตัวกุ้งจะพบเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นของกลุ่มปรสิตไมโครสปอริเดียแทรกอยู่จำนวนมากในตับและตับอ่อนและอวัยวะสำคัญอื่นๆ ของกุ้ง (ภาพที่ 66) ทำให้อวัยวะต่างๆ เหล่านี้ของกุ้งเสื่อมสภาพลง

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งในกลุ่มที่ 1 ที่ติดเชื้อในตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อ พบว่ามีกลุ่มของปรสิตไมโครสปอริเดียแทรกอยู่ในตับและตับอ่อนเกือบทั้งหมด (ภาพที่ 67) ทำให้การทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งเอนไซม์ต่างๆ ที่ช่วยในการย่อยอาหารและเก็บสะสมสารอาหารลดลง จึงอ่อนแอจนถึงระดับที่การเจริญเติบโตลดลง ที่ระยะเวลาการเลี้ยงระหว่าง 75-105 วัน พบว่าปริมาณกุ้งติดเชื้อที่ได้จากการสุ่มด้วยแหมีจำนวนลดลงเนื่องจากกุ้งติดเชื้อในระดับรุนแรงจะทยอยตายและบางตัวจะถูกกุ้งปกติที่แข็งแรงกว่ากินเพราะหลังจากจับกุ้งที่ระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน พบว่าผลผลิตและอัตราการรอดตายของกุ้งจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียซึ่งจะ

เห็นได้ชัดจนมากในบ่อทดลองที่ 2 โดยผลผลิตและอัตราการรอดตายของกุ้งสูงที่สุด (ตารางที่ 6) เนื่องจากมีปริมาณการติดเชื้อของกุ้งที่ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วันน้อยที่สุด (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียรุนแรงมากมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไม่ลดลง

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในบ่อเลี้ยงที่ 1 ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียแตกต่างกัน

ความรุนแรง	ระยะเวลาการเลี้ยง					
	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน
กลุ่มที่ 3	4.4±0.4 ^a	5.9± 0.5 ^a	7.9±0.4 ^a	10.1±0.6 ^a	12.4 ± 0.5 ^a	15.2±0.8 ^a
กลุ่มที่ 2	3.8±0.5 ^b	5.6± 0.7 ^b	7.1± 0.8 ^b	9.1± 0.9 ^b	10.9 ±0.8 ^b	14.1±1.1 ^b
กลุ่มที่ 1	2.9±0.6 ^c	4.2±0.3 ^c	4.8±0.7 ^c	6.6 ±0.5 ^c	10.4 ±0.6 ^b	11.5±1.1 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในบ่อเลี้ยงที่ 2 ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียแตกต่างกัน

ความรุนแรง	ระยะเวลาการเลี้ยง					
	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน
กลุ่มที่ 3	4.4±0.3 ^a	6.0±0.5 ^a	8.0±0.4 ^a	10.1±0.6 ^a	12.3±0.4 ^a	16.2±0.3 ^a
กลุ่มที่ 2	3.7±0.5 ^b	5.0±0.7 ^b	7.1±0.8 ^b	9.0±0.9 ^a	10.5±0.4 ^b	13.8±1.5 ^b
กลุ่มที่ 1	3.0±0.5 ^c	4.1±0.3 ^c	4.8±0.7 ^c	6.8±0.4 ^b	10.4±0.6 ^c	11.3±1.3 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวในบ่อเลี้ยงที่ 3 ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียแตกต่างกัน

ความรุนแรง	ระยะเวลาการเลี้ยง					
	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน	105 วัน	120 วัน
กลุ่มที่ 3	4.4 ± 0.4 ^a	5.9 ± 0.5 ^a	7.9 ± 0.4 ^a	10.1 ± 0.6 ^a	12.4 ± 0.5 ^a	15.9 ± 0.4 ^a
กลุ่มที่ 2	3.8 ± 0.5 ^b	5.1 ± 0.7 ^b	7.1 ± 0.8 ^b	9.1 ± 0.8 ^a	10.9 ± 0.8 ^b	14.6 ± 0.4 ^b
กลุ่มที่ 1	2.9 ± 0.6 ^c	4.2 ± 0.3 ^c	4.8 ± 0.7 ^c	6.6 ± 0.5 ^b	10.4 ± 0.6 ^b	12.1 ± 1.6 ^c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 6 ผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียแตกต่างกัน

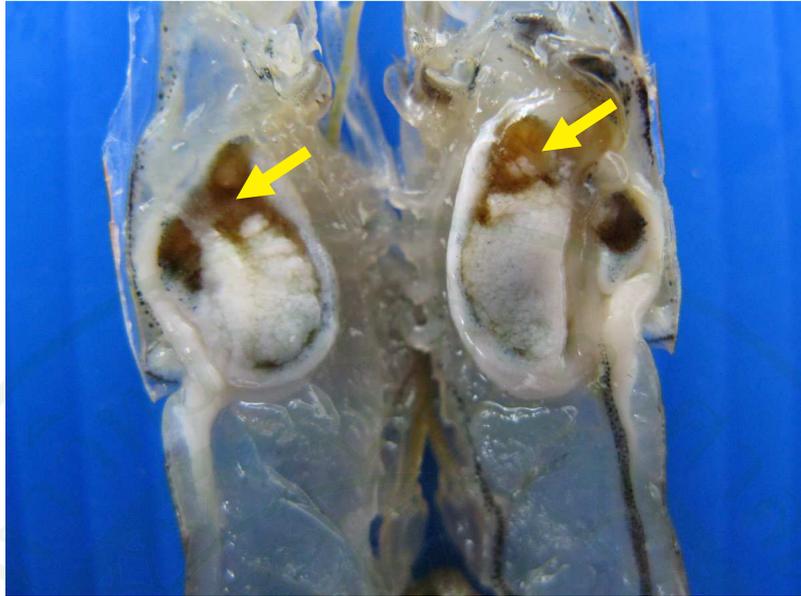
บ่อเลี้ยง	ผลิตรวม (กก.)	ผลผลิตต่อไร่ (กก./ไร่)	อัตราการรอดตาย (%)
1	10,536	2,107	69.5
2	11,140	2,228	71.6
3	10,086	2,017	67.2



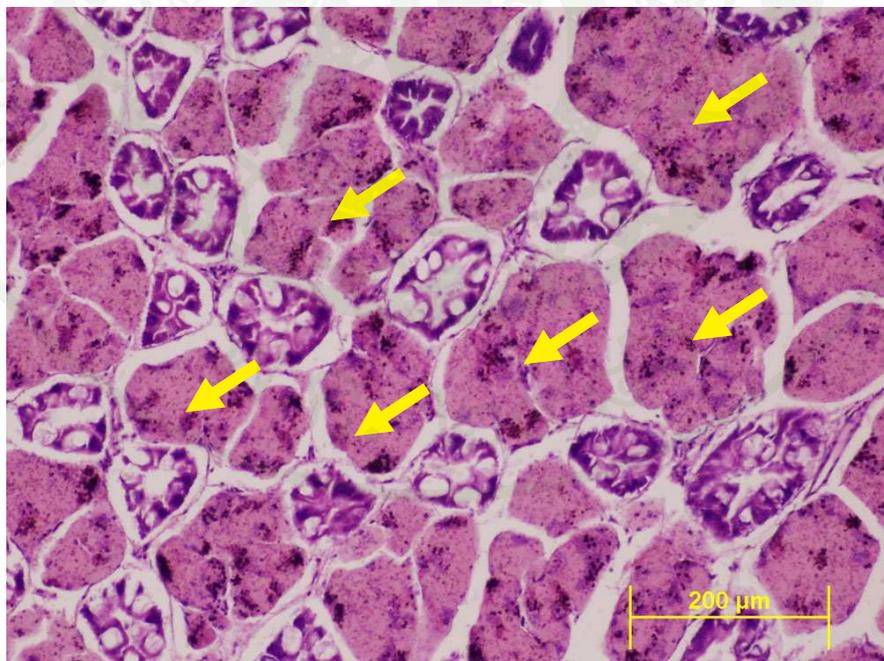
ภาพที่ 64 กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อทั้งในตับและตับอ่อนและในกล้ามเนื้อลำตัว (A) มีขนาดเล็กกว่ากุ้งที่ติดเชื้อเฉพาะในส่วนของกล้ามเนื้อลำตัวอย่างเดียว (B) และกุ้งปกติอย่างชัดเจน (C)



ภาพที่ 65 กุ้งที่มีการติดเชื้อทั้งในตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัว มีลำตัวพอมและเปลือกนูนมากกว่ากุ้งปกติ (ตัวบน) อย่างชัดเจน



ภาพที่ 66 กิ่งที่ติดเชื่อในตับและตับอ่อนมีเนื้อเยื่อสีขาวแทรกอยู่ในบริเวณตับจำนวน
มากจนเหลือส่วนของตับและตับอ่อนที่เป็นปกติ (สรีร) น้อยมาก



ภาพที่ 67 กิ่งที่ติดเชื่อในตับและตับอ่อนมีปรสิตไมโครสปอริเดีย (สรีร) แทรกอยู่
จำนวนมาก (H&E, bar=200 μM)

5. การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไม

การทดลองการถ่ายทอดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียสู่กุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด แต่ละชุดการทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ชุดการทดลองที่ 1 แบ่งเป็น กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ให้กินอาหารสำเร็จรูป กลุ่มที่ 2 ให้กินสิ่งขับถ่ายของปลาหมอเทศ ที่กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย กลุ่มที่ 3 ให้กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย และกลุ่มที่ 4 ให้กินสิ่งขับถ่ายของปลาหมอเทศที่กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียพร้อมกับใส่ดินตะกอนบ่อ กุ้งลงในตู้ทดลอง ชุดการทดลองที่ 2 แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลองเช่นเดียวกับชุดที่ 1 แต่ใช้ปลา กะพงขาวในการทดลอง และชุดการทดลองที่ 3 ใช้ปลาตะกรับในการทดลอง พบว่าเมื่อเลี้ยงเป็น ระยะเวลา 2 เดือนไม่เกิดลักษณะที่แสดงว่ากุ้งมีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (ภาพที่ 68) และ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เป็นการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในทุกการ ทดลองและจากการตรวจด้วยวิธีเทคนิคพีซีอาร์พบว่ากุ้งจากทุกการทดลองที่ให้กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อ ไมโครสปอริเดียและกุ้งที่ให้กินสิ่งขับถ่ายของปลานั้นมีลักษณะของแถบสีจางๆ แบบเดียวกับมีการ ติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียในกุ้งทั้งสองกลุ่มนี้แต่เป็นการติดเชื้อในระดับที่ไม่รุนแรง เมื่อ เปรียบเทียบกับกุ้งที่ติดเชื้อ (ภาพที่ 69) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่กินอาหาร ได้ ทุกอย่าง แม้แต่สิ่งขับถ่ายของกุ้งเอง ทำให้สามารถตรวจการติดเชื้อไมโครสปอริเดียด้วยวิธีพีซีอาร์ ให้ผลบวกแบบไม่รุนแรง และเมื่อนำปลาหมอเทศ ปลาตะพงขาว และปลาตะกรับที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ ไมโครสปอริเดียติดต่อกันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ และเลี้ยง โดยให้กินเนื้อกุ้งปกติเป็นอีกเป็น ระยะเวลาอีก 1 สัปดาห์แล้วจึงนำไปตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ผลที่ได้คือ ปลาหมอเทศและปลาตะกรับ ไม่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย แต่ปลาตะพงขาวมีการติดเชื้อที่ชัดเจน (ภาพที่ 69) แต่ไม่พบความ ผิดปกติที่สามารถสังเกตจากภายนอกของปลาตะพงขาวที่มีผลเป็นบวกจากการตรวจด้วยพีซีอาร์ว่า ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย และเมื่อนำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อก็ไม่พบไมโครสปอริเดียใน ส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อปลาตะพงขาว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปลาตะพงขาวเป็นปลาที่กินเนื้อจึงสามารถ กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อได้ปริมาณมากกว่าปลาหมอเทศและปลาตะกรับที่เป็นปลาที่กินได้ทั้งพืชและ สัตว์ ซึ่งการกินเนื้อกุ้งติดเชื้อในปริมาณมากนั้นอาจจะทำให้มีสปอร์ของปรสิตไมโครสปอริเดีย หลงเหลืออยู่ในช่องทางเดินอาหารและอวัยวะภายในต่างๆ ของปลาตะพงขาวได้ และหลังจากให้ ปลาทั้งสามชนิดกินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียแล้วมีการขับถ่ายของเสียออกมาและนำสิ่ง ขับถ่ายจากปลาทั้งสามชนิดมาปาดบนสไลด์แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์ของ ไมโครสปอริเดียจะถูกย่อยจนแยกเป็นสปอร์เดี่ยวๆ (ภาพที่ 70) ซึ่งปกติแล้วสปอร์ของปรสิตไม โครสปอริเดีย *Thelohania* จะรวมอยู่ในถุงหุ้มสปอร์ และเพื่อยืนยันว่ากุ้งทดลองได้กินสปอร์ของ

ปรสิติ ไมโครสปอริเดีย จึงมีการนำสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่กินสิ่งขับถ่ายของปลาที่กินกุ้งติดเชื้อมาปาดบนสไลด์พบว่า มีสปอร์เดี่ยวๆ ของปรสิติ ไมโครสปอริเดียเหมือนกับที่พบในสิ่งขับถ่ายของปลา (ภาพที่ 71) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากุ้งที่กินสิ่งขับถ่ายของปลาทั้งสามชนิดจะได้รับสปอร์ของไมโครสปอริเดียเข้าสู่ตัวกุ้งด้วย แต่ก็ไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในกุ้งปกติได้

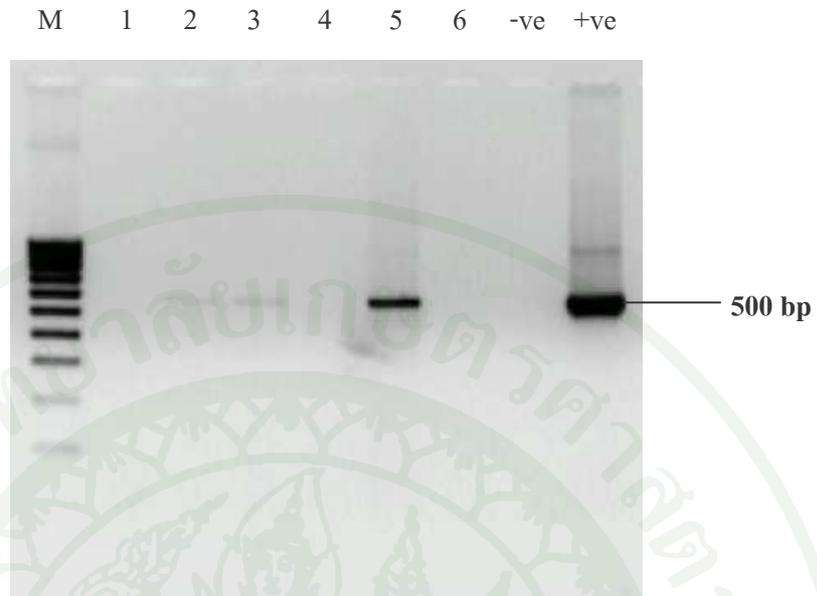
จากการทดลองถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียในห้องปฏิบัติการพบว่า การให้ลูกกุ้งขาวแวนนาไม่ระยะโพสลาาร์วา 10 หรือพี 10 ที่ไม่มีการติดเชื้อปรสิติชนิดนี้กินเนื้อกุ้งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในลูกกุ้งปกติได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Flegel *et al.* (1992) ที่พบว่า การให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียหรือสัมผัสกับน้ำที่มีสปอร์จำนวนมาก ไม่สามารถทำให้กุ้งปกติเกิดโรคได้ นอกจากนั้น Flegel *et al.* (1992) ยังพบว่า *A. penaei* ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อจากกุ้งที่ป่วยไปยังกุ้งปกติอื่นๆ ได้ และการถ่ายทอดเชื้อจากแม่กุ้งผ่านไข่ไม่น่าจะเป็นไปได้ Owens and Glazebrook (1988) พบว่าการนำกุ้งป่วยที่ติดเชื้อแช่แข็งจะทำให้ผนังเซลล์ของไมโครสปอริเดียเสียหายได้ และเมื่อให้ลูกกุ้งขาวระยะพี 10 กินสิ่งขับถ่ายของปลาหมอเทศ ปลากระพงขาว ปลาตะกรับ ที่ให้กินเนื้อกุ้งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียก็ไม่พบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในลูกกุ้งขาวเช่นกัน ซึ่งต่างจากรายงานของ Iversen and Kelly (1976) สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อไมโครสปอริเดียได้ โดยการให้ลูกกุ้ง *P. duorarum* กินสิ่งขับถ่ายของปลา spotted sea trout ที่กินกุ้งติดเชื้อไมโครสปอริเดีย

ผลการทดลองการถ่ายทอดเชื้อในบ่อพักน้ำ โดยการกั้นคอกในพื้นที่บ่อพักน้ำเก่าที่มีกุ้งขาวแวนนาไม่ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียอยู่ร่วมกับปลาหมอเทศ โดยกั้นคอกมุ้งในลอนสีฟ้าขนาด 26 ตาต่อตารางนิ้ว กั้นคอกความกว้าง 2 เมตร ยาว 4 เมตร ในบ่อพักน้ำ หลังจากนั้นปล่อยลูกกุ้งขาวแวนนาไม่ระยะพี 10 จำนวน 125 ตัวต่อตารางเมตร ใช้อาหารสำเร็จรูปตลอดการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยมีการสังเกตความผิดปกติภายนอกของตัวกุ้งด้วยการส่องกล้องโดยใช้อาหารใส่ในยอกทุก 15 วัน พบว่าตลอดระยะเวลาการเลี้ยงไม่พบกุ้งที่มีลักษณะของการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (ภาพที่ 72) และเมื่อนำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเช่นกัน สำหรับการตรวจปลาหมอเทศที่อาศัยในบ่อพักน้ำและในบ่อเลี้ยงกุ้งด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่าปลาหมอเทศที่อาศัยอยู่ในบ่อพักน้ำและบ่อเลี้ยงไม่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย ซึ่งนอกจากนี้ยังมีการเก็บตัวอย่างแพลงก์ตอนสัตว์ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียและบริเวณชายฝั่งทะเล (ภาพที่ 73) ที่มีการติดตั้งท่อสูบน้ำเข้ามาใช้เลี้ยงกุ้งในฟาร์มมาศึกษาทางพยาธิสภาพก็ไม่พบลักษณะสปอร์ของไมโครสปอริเดียในตัวของแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโคพีพอดที่เก็บจากบริเวณที่กล่าวข้างต้น (ภาพที่ 74

และ 75) เนื่องจากผลการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมพบว่าการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมในกุ้งขาวแวนนาไมจะเกิดขึ้นในช่วงที่กุ้งอยู่ในระยะโพสลาร์วา ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ที่เจ้าบ้านระยะต้นของปรสิตไมโครสปอริเดียมในกุ้งขาวอาจจะเป็นแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโคพีพอดซึ่งเป็นอาหารชนิดหนึ่งที่มีในบ่อของกุ้งขาวระยะโพสลาร์วา นอกจากนี้มีการรายงานว่ากลุ่ม Amphipod ที่อาศัยอยู่ที่พื้นท้องน้ำในบริเวณชายฝั่งทางด้านตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกาติดเชื้อไมโครสปอริเดียม *Thelohania* (Johnson, 1984) แต่จากการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อก็ไม่พบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมในแพลงก์ตอนสัตว์ในบ่อเลี้ยงและในบริเวณชายฝั่งทะเลที่นำน้ำมาใช้เลี้ยงกุ้ง จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียมในกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ โดยการให้กุ้งขาวปกติกินกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมไม่สามารถทำให้กุ้งปกติติดเชื้อไมโครสปอริเดียมได้ และกุ้งขาวปกติที่กินสิ่งขับถ่ายจากปลาหมอเทศ ปลากระพงขาวและปลาตะกรับที่กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียมไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในกุ้งปกติได้เช่นกัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจะต้องมีปัจจัยอื่นๆ เกี่ยวข้อง ซึ่งการทดลองในห้องปฏิบัติการไม่สามารถที่จะทำให้มีสภาวะเหมือนกับในบ่อเลี้ยงได้ทั้งหมด นอกจากนี้ปลาที่อาจจะไม่ใช่เจ้าบ้านระยะต้นของปรสิตไมโครสปอริเดียม จึงไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมในห้องปฏิบัติการได้



ภาพที่ 68 กุ้งขาวแวนนาไมที่ผ่านการทดลองการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียมในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 2 เดือน แต่ไม่สามารถทำให้มีการติดเชื้อได้



ภาพที่ 69 ผลการศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียด้วยวิธีพีซีอาร์

M = molecular marker ขนาด 100 bp

1 = กุ้งขาวแวนนาไมปกติ

2 = กุ้งขาวที่กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อ

3 = กุ้งขาวที่กินสิ่งขับถ่ายของปลากะพงขาวที่กินกุ้งติดเชื้อ

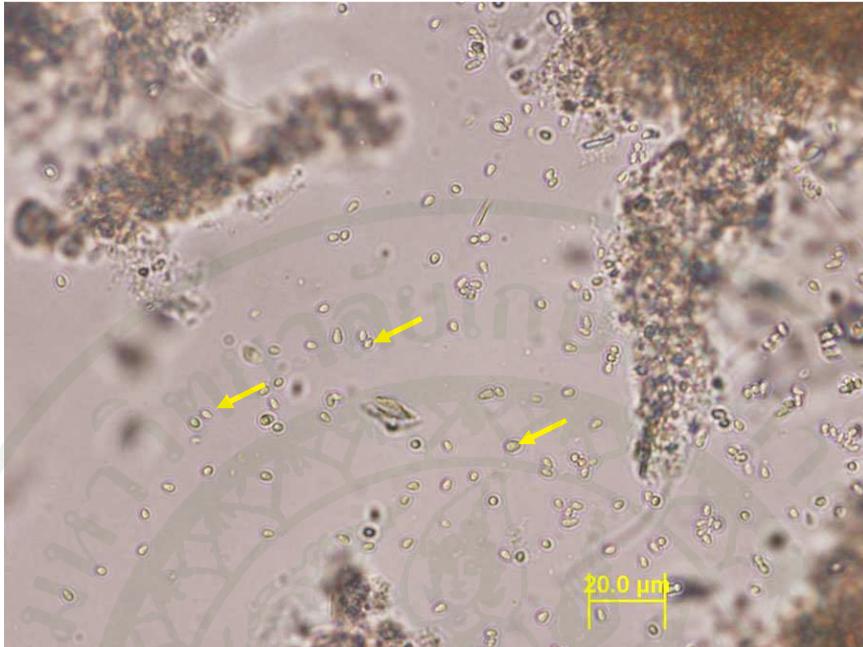
4 = ปลาคะกรับที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ

5 = ปลากะพงขาวที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ

6 = ปลาหมอเทศที่กินกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย

-ve = ตัวอย่างควบคุมผลลบ

+ve = ตัวอย่างควบคุมผลบวก



ภาพที่ 70 สปอร์เดี่ยวๆ (สรชี) ของปรสิตไมโครสปอริเดียที่อยู่ในสิ่งขับถ่ายของปลาที่กิน
กุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (bar=20 μM)



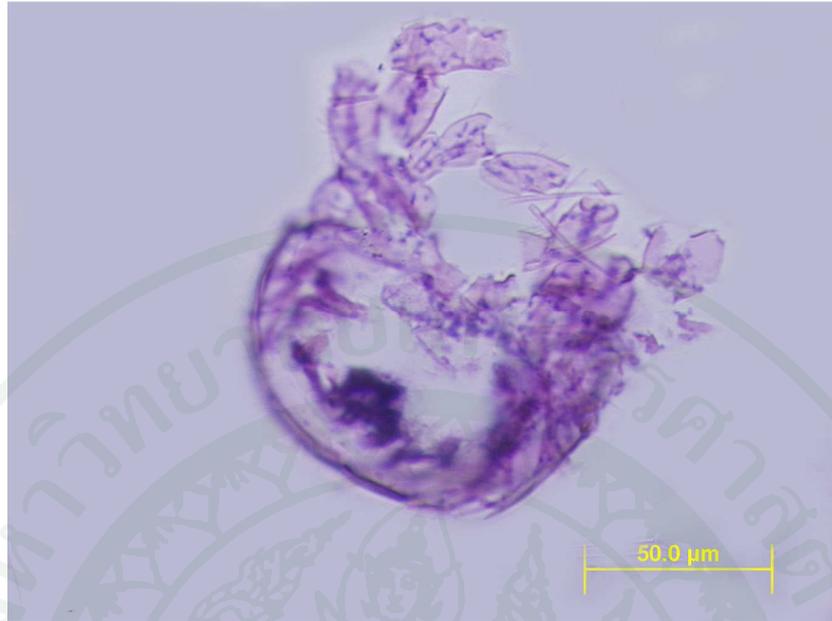
ภาพที่ 71 สปอร์เดี่ยวๆ (สรชี) ของปรสิตไมโครสปอริเดียที่อยู่ในสิ่งขับถ่ายของกุ้งที่
กินสิ่งขับถ่ายของปลาที่กินกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย (bar=50 μM)



ภาพที่ 72 การตรวจสอบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียของกุ้งขาวที่เลี้ยงในคอกที่อยู่ในบ่อพักน้ำเมื่อระยะเวลาการเลี้ยง 30 วัน



ภาพที่ 73 แพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโคพีพอดที่พบในบ่อเลี้ยงและบริเวณชายฝั่งทะเลที่นำน้ำมาใช้เลี้ยงกุ้งขาวที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย



ภาพที่ 74 ลักษณะของเนื้อเยื่อแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโคพีพอดที่ไม่พบปรสิตไมโครสปอริเดีย (H&E, bar= 50 μM)



ภาพที่ 75 ลักษณะของเนื้อเยื่อแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มโคพีพอดไม่พบปรสิตไมโครสปอริเดียภายในส่วนต่างๆ (H&E, bar= 50 μM)

6. การศึกษาผลของฤดูกาลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยง

ทำการศึกษาในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่อำเภอทับสะแก จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ที่ประกอบด้วยบ่อเลี้ยงกุ้งขนาด 5 ไร่ จำนวน 3 บ่อ โดยทำการศึกษา 2 รอบการเลี้ยง รอบที่ 1 ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึง กุมภาพันธ์ 2551 และรอบที่ 2 ช่วงเดือนพฤษภาคม 2551 ถึง เดือนสิงหาคม 2551 โดยเริ่มสุ่มกุ้งด้วยแหเมื่อเลี้ยงกุ้งนาน 45 วัน และบันทึกข้อมูลปริมาณการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในบ่อทุก 15 วัน จนกระทั่งจับกุ้ง พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมทั้งสองรอบการเลี้ยงเริ่มพบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียตั้งแต่ประมาณวันที่ 20 วันของการเลี้ยง โดยกุ้งที่ติดเชื้อจะมีลักษณะเป็นก้อนสีขาวขุ่นตามส่วนต่างๆ ของลำตัว สามารถสังเกตได้จากการยกยอเนื่องจากกุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะเข้ามากินอาหารในขอมมากกว่ากุ้งปกติ ซึ่งทั้งสองรอบการเลี้ยงจะมีการประเมินกุ้งที่ติดเชื้อจากการสุ่มด้วยแห

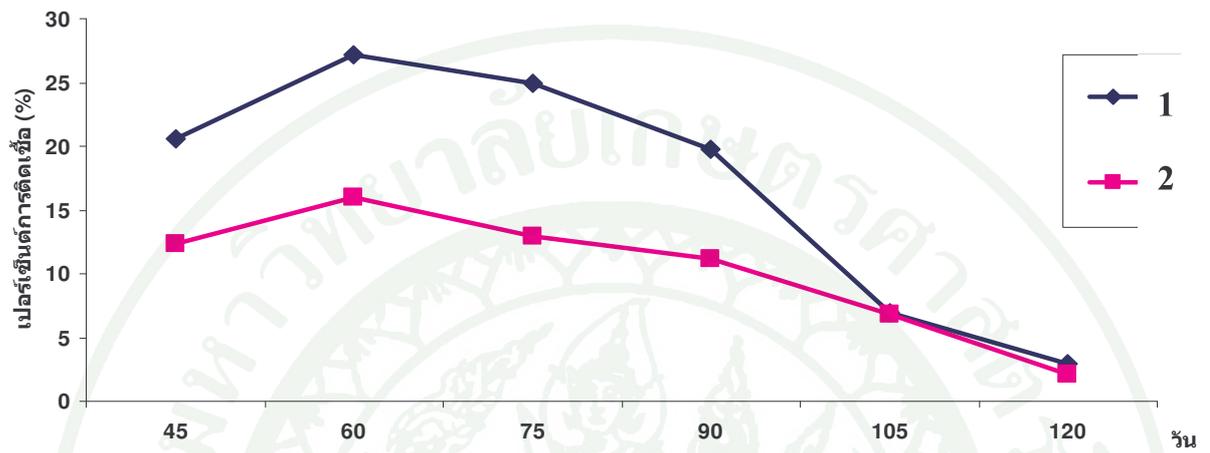
ผลการศึกษาพบว่า การเลี้ยงรอบที่ 1 มีกุ้งติดเชื้อเฉลี่ย 20.59 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรอบการเลี้ยงที่ 2 มีปริมาณการติดเชื้อเฉลี่ยเพียง 12.36 เปอร์เซ็นต์ และทั้งสองรอบการเลี้ยงมีปริมาณการติดเชื้อสูงสุดที่ระยะเวลาการเลี้ยงเดียวกันคือ 60 วัน (ภาพที่ 76) โดยในรอบการเลี้ยงที่ 1 มีปริมาณการติดเชื้อเฉลี่ย 27.19 เปอร์เซ็นต์ ส่วนรอบการเลี้ยงที่ 2 คือ 16 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยง 120 วัน ทั้งการเลี้ยงรอบ 1 และรอบ 2 มีปริมาณการติดเชื้อไมโครสปอริเดียเฉลี่ยเหลือเพียง 3.51 และ 2.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าปริมาณกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียของการเลี้ยงรอบ 1 มากกว่าการเลี้ยงรอบ 2 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงทั้งนี้เนื่องจากในรอบการเลี้ยง 1 เป็นอยู่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์ซึ่งสำหรับประเทศไทยเป็นช่วงเวลาที่อยู่ในฤดูหนาวที่ได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือมรสุมนี้มีแหล่งกำเนิดจากบริเวณความกดอากาศสูงจากซีกโลกเหนือ แถบประเทศมองโกเลียและจีน จึงพัดพาเอามวลอากาศเย็นและแห้งจากแหล่งกำเนิดเข้ามาปกคลุม ทำให้อากาศหนาวเย็นและแห้งแล้งทั่วไป โดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนภาคใต้จะมีฝนตกชุกโดยเฉพาะภาคใต้ฝั่งตะวันออก เนื่องจากมรสุมนี้นำความชุ่มชื้นจากอ่าวไทยเข้ามาปกคลุม เนื่องจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ทำการศึกษาแห่งนี้ตั้งอยู่ในบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย จึงอาจได้รับผลกระทบจากมรสุมนี้โดยจะพัดพาเอาตะกอนสารอินทรีย์ เศษซากสิ่งมีชีวิตต่างๆ รวมทั้งสปอร์ของปรสิตไมโครสปอริเดีย ซึ่งสามารถลอยลอยอยู่ในน้ำได้ (Weiss, 2001) เข้ามาอยู่ในบริเวณท่อสูบน้ำเข้าสำหรับใช้เลี้ยงกุ้งของฟาร์ม (ภาพที่ 77) เมื่อมีการสูบน้ำเข้าบ่อเพื่อเตรียมน้ำสำหรับเลี้ยงกุ้งโดยไม่มีการใช้สารเคมี

สำหรับฆ่าเชื้อโรค จึงทำให้สปอร์ของปรสิติไมโครสปอริเดียหลุดรอดเข้าสู่บ่อเลี้ยงกุ้งได้ง่าย และทำให้ความรุนแรงของการติดเชื้อปรสิติไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไมจากบ่อเลี้ยงในช่วงเวลาดังกล่าวนี้มากกว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงรอบ 2 ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคมที่ไม่ได้รับอิทธิพลของลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าฤดูกาลและสภาวะอากาศในแต่ละรอบของการเลี้ยงมีผลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในบางพื้นที่ โดยเฉพาะในบริเวณที่มีเขตติดต่อกับชายฝั่งทะเลและได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมที่จะพัดพาเอาสิ่งต่างๆ จากทะเลเข้าสู่บริเวณชายฝั่ง ซึ่งตรงข้ามกับในพื้นที่จังหวัดสมุทรสาครและสมุทรปราการที่มีการเลี้ยงกุ้งแช่บ้วยแบบดั้งเดิม (ภาพที่ 78) พบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งแช่บ้วยรุนแรง(ภาพที่ 79 และ 80) ในช่วงเดือนเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคมซึ่งได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ โดยลักษณะของกุ้งแช่บ้วยที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะเหมือนกับกุ้งขาวแวนนาไมคือบริเวณต่างๆ บนลำตัวกุ้งมีสีขาวขุ่น โดยเฉพาะเมื่อผ่าดูตามยาว (ภาพที่ 81) และเมื่อนำก้อนเนื้อสีขาวขุ่นนั้นมาปาดบนสไลด์แล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบสปอร์ของปรสิติไมโครสปอริเดียมีรูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์ อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ (ภาพที่ 82) เมื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบว่ากุ้งแช่บ้วยที่ติดเชื้อจะมีปรสิติไมโครสปอริเดียแทรกอวัยวะต่างๆ โดยกุ้งแช่บ้วยที่ติดเชื้อจะพบปรสิติแทรกในอวัยวะตับและตับอ่อน ต่อมน้ำเหลือง (ภาพที่ 83) กล้ามเนื้อ รวมทั้งอวัยวะต่างๆ เหมือนกับกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อปรสิติชนิดนี้

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียของกุ้งขาวแวนนาไมใน 2 รอบการเลี้ยง

รอบการเลี้ยง	ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)					
	45	60	75	90	105	120
1	20.59±1.97	27.19±1.66	24.94±1.1	19.81±1.54	7.0±1.1	3.51±0.66
2	12.36±2.84	16.0±2.94	12.5±0.46	11.2±3.61	6.8±1.57	2.1±0.75



ภาพที่ 76 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียของกุ้งขาวแวนนาไมในสองรอบการเลี้ยง



ภาพที่ 77 ท่อสูบน้ำเข้าในบ่อเลี้ยงของฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมติดตั้งอยู่บริเวณชายฝั่งทะเลที่ได้รับอิทธิพลของกระแสน้ำและคลื่นโดยตรง



ภาพที่ 78 บ่อเลี้ยงกุ้งเขมปัตย์แบบดั้งเดิมที่ใช้การเปิดประตูน้ำเพื่อรับลูกกุ้งจากธรรมชาติเข้าสู่บ่อเลี้ยง



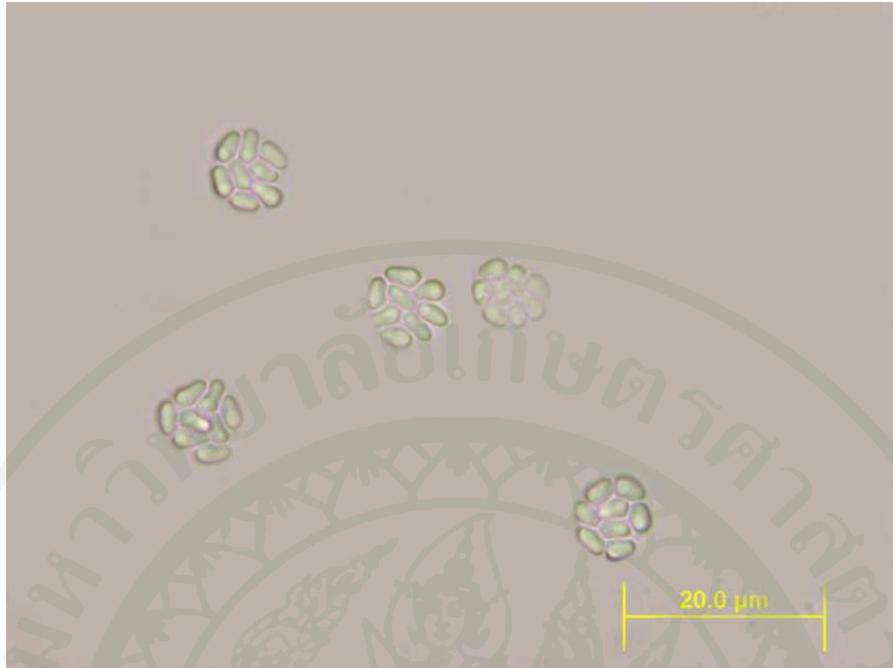
ภาพที่ 79 ลักษณะของกุ้งเขมปัตย์ติดเชื้อไมโครสปอริเดียซึ่งเลี้ยงแบบดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดสมุทรสาคร



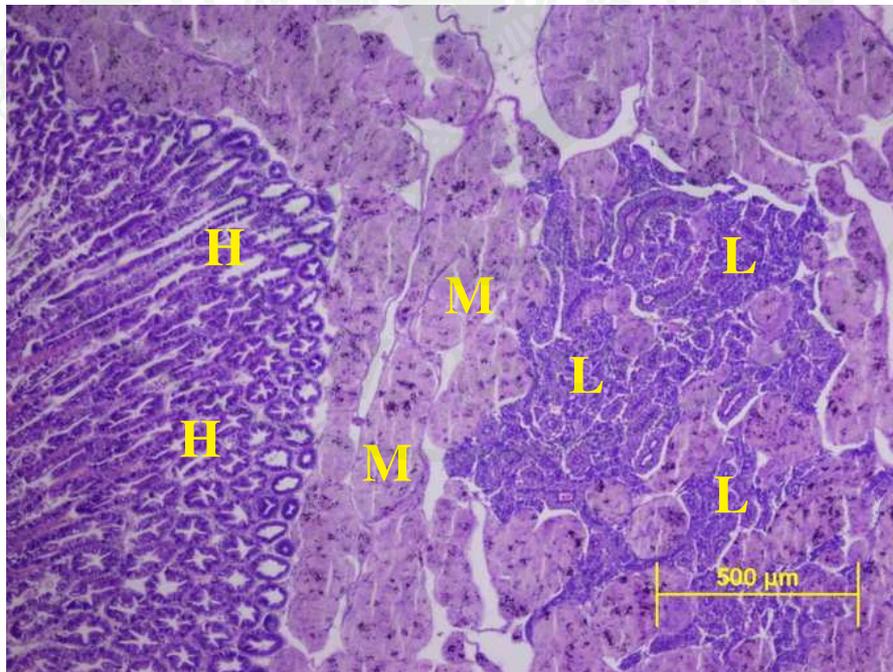
ภาพที่ 80 ลักษณะของกุ้งแชบ๊วยติดเชื้อไมโครสปอริเดียซึ่งเลี้ยงแบบดั้งเดิมในพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการ



ภาพที่ 81 กุ้งแชบ๊วยที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียผ่าตามยาวมีก้อนสีขาวขุ่นของปรสิตแทรกอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อด้านบนของลำตัวกุ้งและบริเวณส่วนหัวกุ้งด้วย



ภาพที่ 82 สปอร์ของไมโครสปอริเดียมีรูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์ อยู่ภายในถุงหุ้มสปอร์ (bar= 20 μM)



ภาพที่ 83 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อน (H) และต่อมน้ำเหลือง (L) ของกิ้งเขปัวที่ติดเชื้อจะพบปรสิตไมโครสปอริเดียแทรกอยู่จำนวนมาก (M) (H&E, bar=500 μM)

7. การศึกษาการใช้คลอรีนในการป้องกันการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียสามารถสังเกตเห็นได้ตั้งแต่ 15-20 วันแรก หลังจากปล่อยกุ้ง โดยการสังเกตการยกขาในบ่อเลี้ยงพบว่าบ่อควบคุมกุ้งขาวแวนนาไมที่พบในยอส่วนใหญ่จะเป็นกุ้งติดเชื้อที่มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวขุ่นในส่วนต่างๆ (ภาพที่ 84) ส่วนบ่อทดลองพบจำนวนกุ้งที่ติดเชื้อในยอน้อยกว่าในบ่อควบคุมและเมื่อกุ้งมีขนาดใหญ่ขึ้นลักษณะดังกล่าวก็จะสามารถเห็นได้ชัดเจนโดยกุ้งจะมีเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นได้ตั้งแต่ส่วนหัวจนถึงส่วนหางของกุ้งซึ่งจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการติดเชื้อ (ภาพที่ 85) และเมื่อนำก้อนเนื้อสีขาวขุ่นจากกุ้งที่ติดเชื้อมาปาดบนสไลด์แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าปรสิตไมโครสปอริเดียที่มีลักษณะเป็นสปอร์รูปร่างรีขนาด 2-3 ไมโครเมตร ซึ่งรวมกันอยู่ในถุงหุ้มสปอร์ จำนวน 8 สปอร์ ผลการทดลองพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมในบ่อควบคุมที่ไม่มีการใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำก่อนการเลี้ยงมีปริมาณกุ้งติดเชื้อมากกว่าในบ่อทดลองที่มีการใช้คลอรีน โดยปริมาณการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในบ่อควบคุมมีค่าสูงสุดในวันที่ 50 ของการเลี้ยงประมาณ 25-27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณการติดเชื้อของบ่อควบคุมมีค่าสูงสุดในวันที่ 50 เช่นกัน แต่มีปริมาณการติดเชื้อสูงสุด เพียง 5-6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) โดยปริมาณของกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะลดน้อยลงตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งปริมาณกุ้งที่ติดเชื้อในบ่อควบคุมและบ่อทดลองในขณะที่จับกุ้งหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 120 วันจะเหลือเพียง 3.42 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าปริมาณผลผลิต อัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไมของบ่อทดลองที่มีการใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำก่อนปล่อยลูกกุ้งจะสูงกว่าบ่อควบคุมที่ไม่มีการใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 9) แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าในบ่อทดลองจะมีการใช้คลอรีนความเข้มข้น 18 พีพีเอ็มในการฆ่าเชื้อโรคและพาหะต่างๆ ในบ่อเลี้ยงก่อนปล่อยกุ้งแต่ก็ยังมีปริมาณกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดีย 5.4 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในบ่อเลี้ยงกุ้งมีปริมาณดินตะกอนที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงซึ่งสามารถลดประสิทธิภาพของคลอรีนในการฆ่าเชื้อโรคต่างๆ ทำให้สปอร์ของปรสิตไมโครสปอริเดียยังคงมีชีวิตและสามารถก่อให้เกิดโรคได้ โดยความเป็นพิษของคลอรีนจะลดลงเมื่อพีเอชของน้ำมีค่าสูง (Zillich, 1972; Floyd, 1979) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้คลอรีน (ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์) ในอัตรา 18 พีพีเอ็มสำหรับฆ่าเชื้อโรคและพาหะนำโรคต่างๆ ในน้ำก่อนการเลี้ยงกุ้งสามารถลดความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียลงได้



ภาพที่ 84 กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียเริ่มพบในขอมเมื่อกุ้งอายุ 30 วัน



ภาพที่ 85 กุ้งที่ติดเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียพบเนื้อเยื่อสีขาวขุ่นบนส่วนต่างๆ ของลำตัว

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในบ่อที่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำและบ่อที่ไม่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำก่อนการเลี้ยง

บ่อเลี้ยง	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (%)									
	(วัน)									
	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
บ่อทดลอง										
1	1.3	4.5	5.0	4.2	4.1	3.9	2.4	1.6	1.3	0.6
2	3.6	5.2	5.6	5.3	4.7	4.4	2.7	1.5	1.2	0.9
3	2.3	4.7	6.1	5.8	5.4	3.8	2.3	1.3	1.0	0.7
4	2.5	5.5	5.2	4.9	4.7	3.5	2.1	1.1	0.9	0.8
5	1.6	5.3	5.1	4.6	3.9	3.8	1.8	1.2	1.1	0.5
ค่าเฉลี่ย	2.26 ^a	5.04 ^a	5.40 ^a	4.96 ^a	4.56 ^a	3.88 ^a	2.26 ^a	1.34 ^a	1.1 ^a	0.7 ^a
บ่อควบคุม										
1	15.6	23.4	25.1	23.4	21.2	19.1	14.6	8.2	6.4	4.7
2	14.4	26.2	25.6	22.3	20.8	18.8	13.1	6.4	5.3	3.8
3	17.3	27.6	27.3	25.1	23.7	21.4	16.2	7.6	4.5	2.6
4	15.1	20.7	24.1	22.7	20.9	17.7	13.8	6.5	4.7	3.4
5	12.7	24.8	23.7	21.1	19.7	18.2	14.4	7.8	4.3	2.6
ค่าเฉลี่ย	15.02 ^b	24.54 ^b	25.16 ^b	22.92 ^b	21.26 ^b	19.04 ^b	14.42 ^b	7.3 ^b	5.04 ^b	3.42 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 9 ผลการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในบ่อที่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำและบ่อที่ไม่ใช้คลอรีนในการเตรียมน้ำก่อนการเลี้ยง

บ่อเลี้ยง	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการแลกเนื้อ	ผลผลิต (กก.)
บ่อทดลอง			
1	91.5	1.2	9,369.60
2	89.6	1.3	9,175.04
3	90.6	1.3	9,277.44
4	88.9	1.25	9,103.36
5	89.3	1.3	9,144.32
ค่าเฉลี่ย	89.98±1.05 ^a	1.27±0.04 ^a	9,231.36 ±116.6 ^a
บ่อควบคุม			
1	70.5	1.4	7,219.20
2	71.2	1.5	7,290.88
3	69.5	1.45	7,116.80
4	74.5	1.6	7,628.80
5	70.5	1.5	7,219.20
ค่าเฉลี่ย	71.24±1.92 ^b	1.49±0.07 ^b	7,294.98 ± 196.65 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในแนวตั้งที่กำกับด้วยอักษรที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

สรุปผล

1. การศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกึ่งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในฟาร์มสามารถสังเกตเห็นกึ่งเริ่มมีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียเมื่ออายุประมาณ 20-25 วัน กึ่งที่ติดเชื้อจะมีลำตัวกึ่งมีสีขาวขุ่นอยู่ภายใต้เปลือก จากการส่องกึ่งด้วยแหเมื่อกึ่งอายุ 45 วันและหลังจากนั้นทุก 15 วัน พบว่าช่วงเวลาที่พบกึ่งในปอดติดเชื้อมากที่สุดคืออายุประมาณ 60 วันประมาณ 25-28 เปอร์เซ็นต์ กึ่งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียรุนแรงจะอ่อนแอและทยอยตายหรืออาจจะถูกกึ่งขาวในปอดที่แข็งแรงกว่ากิน ทำให้ปริมาณกึ่งขาวที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียลดลงเรื่อยๆ จนเมื่อจับกึ่งจะมีจำนวนกึ่งขาวที่ติดเชื้อเหลืออยู่ในปริมาณน้อยมาก

2. การศึกษาสปอร์ของไมโครสปอริเดียโดยนำส่วนเนื้อเยื่อที่เป็นสีขาวขุ่นมาปาดบนสไลด์แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ มีจำนวน 8 สปอร์อยู่ใน sporophorous vesicle และเมื่อย้อมด้วยสี Giemsa สปอร์ติดสีน้ำเงินชัดเจน ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อจะไม่พบการเกิด encapsulation หรือ xenoma formation ในส่วนต่างๆ ของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไมโครสปอริเดียสกุล *T. penaei* และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเทคนิคพีซีอาร์ตามวิธีการของ Pasharawipas *et al.* (1997) พบว่า กึ่งขาวที่มีการติดเชื้อให้ผลบวกของปรสิท *T. penaei* เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบ *T. penaei* แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับและตับอ่อนและระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อจำนวนมากและจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านบริเวณตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัวของกึ่งที่ติดเชื้อจะพบระยะต่างๆ ของปรสิทชนิดนี้ ตั้งแต่ระยะเริ่มของการแบ่งตัว ซึ่งล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้ม sporophorous vesicle โดยส่วนใหญ่ระยะแรกของการแบ่งตัว (merogony) จะพบในบริเวณกล้ามเนื้อและตับและตับอ่อน การแบ่งตัวในระยะแรกๆ สังเกตได้จากนิวเคลียสจะเป็นแบบ diplokaryotic cells สปอร์ระยะเต็มวัยของปรสิทชนิด *T. penaei* มี 8 สปอร์อยู่ภายในแต่ละ sporophorous vesicle ผนังสปอร์ที่หนาประกอบด้วย exospore และ endospore และภายในสปอร์จะมี polar filament ที่มีลักษณะเป็นท่อยาวอยู่ใกล้กับบริเวณส่วนปลายของสปอร์ (anterior end) ส่วนปลายสุดของสปอร์มี anchoring disc มีลักษณะคล้ายคอกเห็ดและมีท่อเชื่อมต่อด้านล่าง (manubroid) ซึ่งท่อ polar filament จะขยายใหญ่ขึ้น

3. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบว่ากึ่งที่มีการติดเชื้อรุนแรงจะมีไมโครสปอริเดียแทรกอยู่ในตับและตับอ่อนจำนวนมาก ทำให้เซลล์ตับและตับอ่อนฝ่อและเสื่อมลงขนาดลดลงและ

บางส่วนตาย นอกจากนี้ยังพบไมโครสปอริเดียแทรกอยู่ในบริเวณอวัยวะสำคัญอื่นๆ ได้แก่ กระเพาะอาหาร ต่อมน์น้ำเหลือง หัวใจ เหงือก กล้ามเนื้อลำตัว ต่อมเมือก เซลล์ประสาท และบริเวณเนื้อเยื่อสร้างเลือด ซึ่ง อวัยวะหรือต่อมต่างๆ ที่มีไมโครสปอริเดียแทรกอยู่เหล่านี้ส่วนใหญ่จะไม่มีอาการเกิดลักษณะผิดปกติของ เซลล์ยกเว้นในตับและตับอ่อนและกล้ามเนื้อลำตัวที่มีการเกิดการอักเสบเล็กน้อยในบริเวณที่มีไมโครสปอริเดียแทรกอยู่

4. การศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอดตายและผลผลิตของกุ้งขาวแวนนาไมบ่อเลี้ยง พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียแตกต่างกันมีค่าแตกต่างกันตลอดระยะเวลาการเลี้ยง โดยกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียทั้งบริเวณตับและตับอ่อนและบริเวณกล้ามเนื้อลำตัวมีน้ำหนักกุ้งน้อยกว่ากุ้งที่ติดเชื้อบริเวณลำตัวอย่างเดียวและกุ้งปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

5. การทดลองการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียในห้องปฏิบัติการ พบว่าการให้กุ้งขาวปกติกินกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียไม่สามารถทำให้กุ้งปกติติดเชื้อไมโครสปอริเดียได้ และกุ้งขาวปกติที่กินสิ่งขับถ่ายจากปลาหมอเทศ ปลากระพงขาวและปลาดุกที่กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไมโครสปอริเดียไม่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในกุ้งปกติได้เช่นกัน อาจเนื่องมาจากการถ่ายทอดเชื้อไมโครสปอริเดียสู่กุ้งขาวแวนนาไมจะต้องมีปัจจัยอื่นๆ อีกด้วย และปลาไม่น่าจะเป็นเจ้าบ้านระยะต้นของปรสิตไมโครสปอริเดีย

6. สำหรับผลของฤดูกาลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งขาวแวนนาไมในบ่อเลี้ยงพบว่า ฤดูกาลและสภาวะอากาศในแต่ละรอบของการเลี้ยงมีผลต่อความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในบางพื้นที่ โดยเฉพาะในบริเวณที่มีบ่อเลี้ยงกุ้งติดต่อกับชายฝั่งทะเลและได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมที่จะพัดพาเอาสิ่งต่างๆ จากทะเลเข้าสู่บริเวณชายฝั่งบางช่วงฤดูกาล

7. การใช้คลอรีน (ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์) ในอัตรา 18 พีพีเอ็ม เพื่อกำจัดสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ที่อาจจะเข้าไปในบ่อเลี้ยงในระหว่างเตรียมน้ำก่อนปล่อยลูกกุ้งขาวแวนนาไม สามารถลดความรุนแรงของการติดเชื้อไมโครสปอริเดียได้มาก

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกึ่งขาวแวนนาไม่ต่อการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกันของกึ่งขาวแวนนาไม่ต่อเชื้อปรสิตไมโครสปอริเดียต่อไป
2. ควรมีการศึกษาวงจรชีวิตของไมโครสปอริเดีย โดยเฉพาะสัตว์ที่เป็นเจ้าบ้านระยะต่างๆ ของไมโครสปอริเดีย เพื่อหาแนวทางในการป้องกันโรคชนิดนี้ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น
3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความแตกต่างในระดับยีนของปรสิตไมโครสปอริเดียที่ทำให้เกิดโรคในกึ่งขาวแวนนาไม่กับไมโครสปอริเดียที่ทำให้เกิดโรคในกึ่งกุลาดำและกึ่งแซบวัย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

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

_____ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย**. บริษัท เมจิก ฟับบลิเคชัน จำกัด, กรุงเทพฯ.

บพิช จารุพันธุ์. 2546. **โปรโตซัววิทยา**. ภาควิชาสัตววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ประไพศิริ สิริกาญจน. 2546. **ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ (Parasites of Aquatic Animals)**. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. **วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล. แวนาไม (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture)**. สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม่กกาซีน, สมุทรปราการ.

Anderson, I.G., M. Shariff and G. Nash. 1989. A hepatopancreatic microsporidian in pond-reared tiger shrimp, *Penaeus monodon*, from Malaysia. **J. Invertebr. Pathol.** 53: 278-280.

Aquacop. 1984. Penaeid reared brood stock: closing cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. **Proc. World Maricult. Soc.** 10:445-452.

Azevedo, C. and E.U. Canning. 1987. Ultrastructure of a microsporidian hyperparasite, *Unlikaryon legeri* (Microspora), of trematode larvae. **J. Parasitol.** 73:214-223.

Azevedo, C., L. Corral and C.P. Vivarés. 2000. Ultrastructure of the microsporidian *Inodosporus octospora* (Thelohaniidae), a parasite of the shrimp *Palaemon seratus* (Crustacea, Decapoda). **Dis. Aquat. Org.** 41: 151-158.

- Baxter, K.N., R.H. Rigdon and C. Hanna. 1970. *Pleistophora* sp. (Microsporidia: Nosematidae): a new parasite of shrimp. **J. Invertebr. Pathol.** 16: 289-291.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. **A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology.** World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Bergin, T.J. 1986. An overview of aquaculture and disease control. pp. 3-9. *In* J.D. Humphrey and J.S. Langdon (eds.). **Proceedings of Workshop on. Diseases of Australian Fish and Shellfish.**
- Boddeke, R. 1983. Survival strategies of penaeid shrimps and their significance for shrimp culture, pp. 514-523. *In* **Proceedings of the First International Conference on Warmwater Aquaculture, February 1983.** Honolulu, Hawaii.
- Clotilde-Ba and B.S. Togubaye. 1994. Ultrastructure and development of *Agmasoma penaei* (Microspora, Thelohaniidae) found in *Penaeus notialis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) from Senegal. **Eur. J. Parasitol.** 30: 347-353.
- Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrates Guide to Shrimp of the World.** Osprey Books, Huntington, New York.
- Eldred, B. and R. F. Hutton. 1960. On the grading and identification of domestic commercial shrimp (Family Penaeidae) with a tentative world list of commercial penaeids. **Quart. J. Flor. Acad. Sci.** 23:89-118.
- Farfante P. and B. Kensley. 1997. **Penaeid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World, Key and Diagnoses for the Families and Genera.** Memories du Museum National D'Historie Naturelle, Paris, France.

- Fiengenbaum, D.L. 1975. Parasites of the commercial shrimp *Penaeus vannamei* Boone and *Penaeus brasiliensis* Latreille. **Bull. Mar. Sci.** 25: 491-514.
- Flegel, T.W., D. Fegan, S. Kongsom, S. Vuthikornudomkit, S. Sriurairatana, S. Boonyaratpalin, C. Chantanachookin, J. Vickers and O. MacDonald. 1992. Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp diseases in Thailand, pp. 57-112. *In* W. Fulks and K. Main (eds.). **Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asian and the United States**. The Oceanic Institute, Honolulu, HI.
- Floyd, R. 1979. Inactivation by chlorine of single poliovirus particle in water. **Environ. Sci. Technol.** 13(4): 432-432
- Funge-Smith, S. and M. Bringgs. 2003. The introduction of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* into the Asia-Pacific Region. **International Mechanisms for the Control and Responsible Use of Alien Species in Aquatic Ecosystem**. Available Source: <http://www.enaca.org/modules/mydownloads/visit.php?cid=21&lid=447>., April 30, 2008.
- Hazard E.I. and S.W. Oldacre. 1975. Revision of microsporidia (protozoa) close to *Thelohania*, with descriptions of one new family, eight new genera, and thirteen new species. **U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin**. 1530: 1-140.
- Henneguy, F. and P. Thelohan. 1892. Myxosporidies parasites des muscleschez quelques crustacés de capodes. **Ann. Microgr.** 4:617-641.
- Holthuis, L.B. 1980. **Shrimp and Prawns of the World: an Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries**. FAO fisheries synopsis no. 125 v. 1, Rome. 271 p.

- Iversen, E.S. and R.B. Manning. 1959. A new microsporidian parasite from the pink shrimp (*Penaeus duorarum*). **Trans. Am. Fish. Soc.** 88: 130-132.
- Iversen E.S. and N.N. Van Meter. 1964. A record of the microsporidian, *Thelohania duorara*, parasitizing the shrimp, *Penaeus brasiliensis*. **Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean** 14 : 549-553.
- _____ and J.F. Kelly. 1976. Microsporidiosis successfully transmitted experimentally in pink shrimp. **J. Invertebr. Pathol.** 27: 407-408.
- _____, J.F. Kelly and D. Alzamora. 1987. Ultrastructure of *Thelohania dourara*. **J. Fish Dis.** 10: 299-307.
- Jensen, H.M. and S.H. Wellingd. 1972. Development of the polar filament-polaroplast complex in a microsporidian parasite . **J. Protozool.** 19:297-305.
- Johnson, P. T. 1984. Parasites of benthic amphipods: microsporidians of *Ampelisca agassizi* (JUDD) and some other gammarideans. **Fish. bull.** 83:497-505.
- Johnston, L. B., S.H. Vernick and V. Sprague. 1978. Light and electron microscope study of a new species of *Thelohania* (Microsporida) in the shrimp *Pandalus jordani*. **J. Invertebr. Pathol.** 32:278-290.
- Kelly, J.F. 1979. Tissue specificities of *Thelohania dourara*, *Agmesoma penaei* and *Pleistophora* sp., microsporidian parasites of pink shrimp, *Penaeus douraram*. **J. Invertebr. Pathol.** 33: 331-339.
- Lee, D.O'C. and J.F. Wickins. 1992. **Crustacean Farming**. Blackwell Scientific Publication, London.

- Lester, L.J. 1992. Overview of shrimp farming in the western hemisphere, pp. 771-782. *In* A.W. Fast and L.J. Lester eds. **Marine Shrimp Culture Principles and Practice**. Elsevier Amsterdam.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of penaeid shrimp, pp. 393-486. *In* J.P. McVey, ed. **CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture**. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lightner, D.V. 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society.
- Lom, J. and I. Dykova. 1992. **Protozoan Parasites of Fishes**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Mair, J.M. 1980. Salinity and water-type preferences of four species of postlarval shrimp (*Penaeus*) from West Mexico. **J. Exp. Mar. Bio. Eco.** 45: 69-82.
- McGraw, W.J. and J. Scarpa. 2002. Determining ion concentration for *Litopenaeus vannamei* culture in freshwater. **Glob. Aquac. Advocate**. 5: 36-38.
- Mercier, L. 1909. Contribution a` l'e`tude de la sexualite` chez les myxosporidies et chez les microsporidies. **Me`m. Acad. R. de Belg. Cl. Sci.** 2:1-50.
- Overstreet, R.M. 1973. Parasites of some penaeid shrimp with emphasis on reared hosts. **Aquaculture** 2: 105-140.
- Owens, L. and J.S. Glazbrook. 1988. Microsporidian infections in commercial prawns from northern Australia. **Aust. J. Mar. Freshwat. Res.** 39:301-305.

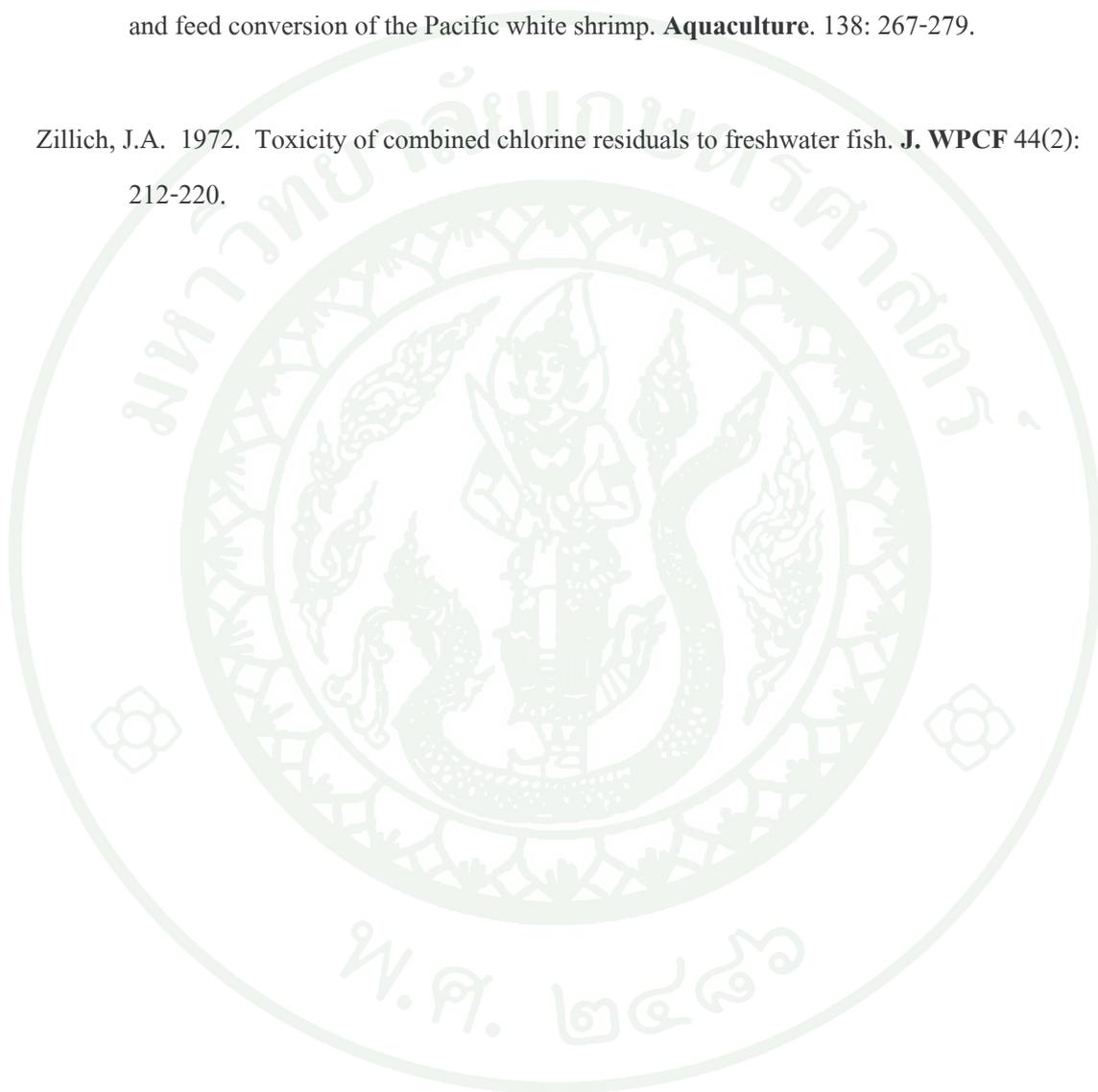
- Pasharawipas, T. and T.W. Flegel. 1994. A specific DNA probe to identify the intermediate host of a common microsporidian parasite of *Penaeus merguensis* and *P. monodon*. **Asian Fish. Sci.** 7: 157-167.
- Pasharawipas, T., T.W. Flegel, S. Chaityaroj, S. Mongkolsuk and S. Sirisinha. 1994. Comparison of amplified RNA gene sequences from microsporidian parasites (*Agmasoma* or *Thelohania*) in *Penaeus merguensis* and *P. monodon*. **Asian Fish. Sci.** 7:169-178.
- Pasharawipas, T., S. Sriurairatana., T.W. Flegel and V. Thammavit. 1997. Use of DNA in situ hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification to study a microsporidian parasite of penaeid shrimp . **Asian Fish. Sci.** 7: 157-167.
- Rigdon, R.H., K.N. Baxter and R.C. Benton. 1975. Hermaphroditic white shrimp *Penaeus setiferus*, parasitized by *Thelohania* sp. **Trans. Am. Fish. Soc.** 104: 292-295.
- Rosenberry, B. 1997. World Shrimp Farming 1997. *In Shrimp News International*, San Diego.
- Sindermann, C.J. 1990. **Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish, Vol. II, 2nd ed.** Academic Press, San Diego, CA.
- Sprague, V. 1950. Notes on three microsporidian parasites of decapod Crustacean of Louisiana coastal waterx. **Occasional Papers Marine Laboratory Louisiana State University.** 5: 1-8.
- _____, V. 1977. Annotated list of species of Microsporidia. pp. 1–333. *In* L.A. Bulla, and T. C. Cheng, (ed.), **Comparative Pathology 2. Systematics of the Microsporidia.** Plenum Press, New York.
- _____, V. and J.A. Couch. 1971. An annotated list of protozoan parasites, hyper-parasites and commensals of decapod Crustacean. **J. Parasitol.** 18:526-573

- Sprague, V., J. J. Becnel and E. I. Hazard. 1992. Taxonomy of phylum Microspora. **Crit. Rev. Microbiol.** 18:285–395.
- Szolloski, D. 1971. Development of *Pleistophora* sp. (Microsporidian) in eggs of the polychaete *Armandia brevis*. **J. Invertebr. Pathol.** 18:1-15.
- Tseng, W.Y. 1987. **Shrimp Mariculture, A Practical Manual.** Department of Fisheries, The university of Papua New Guinea, Port Moresby, Papua New Guinea.
- Tuzet, O., J. Maurand, A. Fize, R. Michel and B. Fenwick. 1971. Proposition d'un nouveau cadre systématique pour les genres de Microsporidies. **C. R. Acad. Sci.** 272: 1268-1271.
- Vernick, S. H., V. Sprague and D. Krause. 1977. Some ultrastructural and functional aspects of the Golgi apparatus of *Thelohania* sp. (Microsporida) in the shrimp *Pandalus jordani* Rathbun. **J. Protozool.** 24:94–99.
- Wassenberg, T.J. and B.J. Hill. 1987. National diet of the tiger prawns *Penaeus esculentus* and *P. semisulcatus*. **Aus. J. Mar. Fresh. Res.** 38: 169-182 .
- Walker, M.H. and G.W. Hirsch. 1972. Ultrastructure observations of a microsporidian parasite in *Linbinia dubia* (Decapoda). I: Early spore development. **Zeitschrift fur Parasitenkunde.** 39: 17-26.
- Weidner, E. 1970. Ultrastructural study of microsporidian development. I: *Nosema* sp. Sprague, 1965 in *Callinectes sapidus* Rathbun. **Zeitschrift fur Zellforschung** 105: 33-54.
- Weiss, L.M., 2001. Microsporidia: emerging pathogenic protists. **Acta Trop.** 78, 89–102.
- Wolbach, S.B., J.L. Todd. and F.W. Palfrey. 1922. pp.13-14. **The Etiology of Pathology Typhus**, Harvard University Press, Cambridge, MA.,

Wyban, J., S.L. Chen, J. Sweeney and W.K. Richards Jr. 1987. Observation on development of a maturation systems for *Penaeus vannamei*. **J. World Aquac. Soc.** 18: 198-20

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

Zillich, J.A. 1972. Toxicity of combined chlorine residuals to freshwater fish. **J. WPCF** 44(2): 212-220.







ภาคผนวก ก
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทาง TEM

1. Fixation

- 1.1 นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ต้องการมาตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ขนาด 1 ลูกบาศก์ มิลลิเมตร
- 1.2 นำตัวอย่างทั้งหมดมา pre-fix ด้วย 3% glutaraldehyde ใน buffer 0.1 M potassium phosphate pH 7.2 fix 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 1% osmium tetroxide ในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชั่วโมง
- 1.5 ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 10-30 นาที

2. Dehydration

- 2.1 นำเนื้อเยื่อผ่านขบวนการ dehydration โดยผ่าน graded series of ethanol ซึ่งจะแทนที่น้ำในตัวอย่างด้วย ethanol เข้มข้น 50%, 70%, 80%, 95% และ 99.9% โดยในแต่ละความเข้มข้นใช้เวลา 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 นาที-1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน
- 2.3 fresh pure resin ที่มี accelerator นาน 1-2 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน ทำ 2-3 ครั้ง

3. Embedding

นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปผ่านกระบวนการ embedding ใน plastic block โดยวางตัวอย่างลงในแบบพิมพ์ชนิด capsule หรือ embedding mold เติม epoxy resin 100 เปอร์เซนต์ ให้ล้นเล็กน้อย

4. Polymerization

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

5. Cutting

นำ plastic block ที่เตรียมได้มาตัด semithin และ ultrathin sections ซึ่งจะตัดโดยเครื่อง ultramicrotome โดยใช้ใบมีดที่เป็นแก้วหรือเพชร (glass or diamondknife)

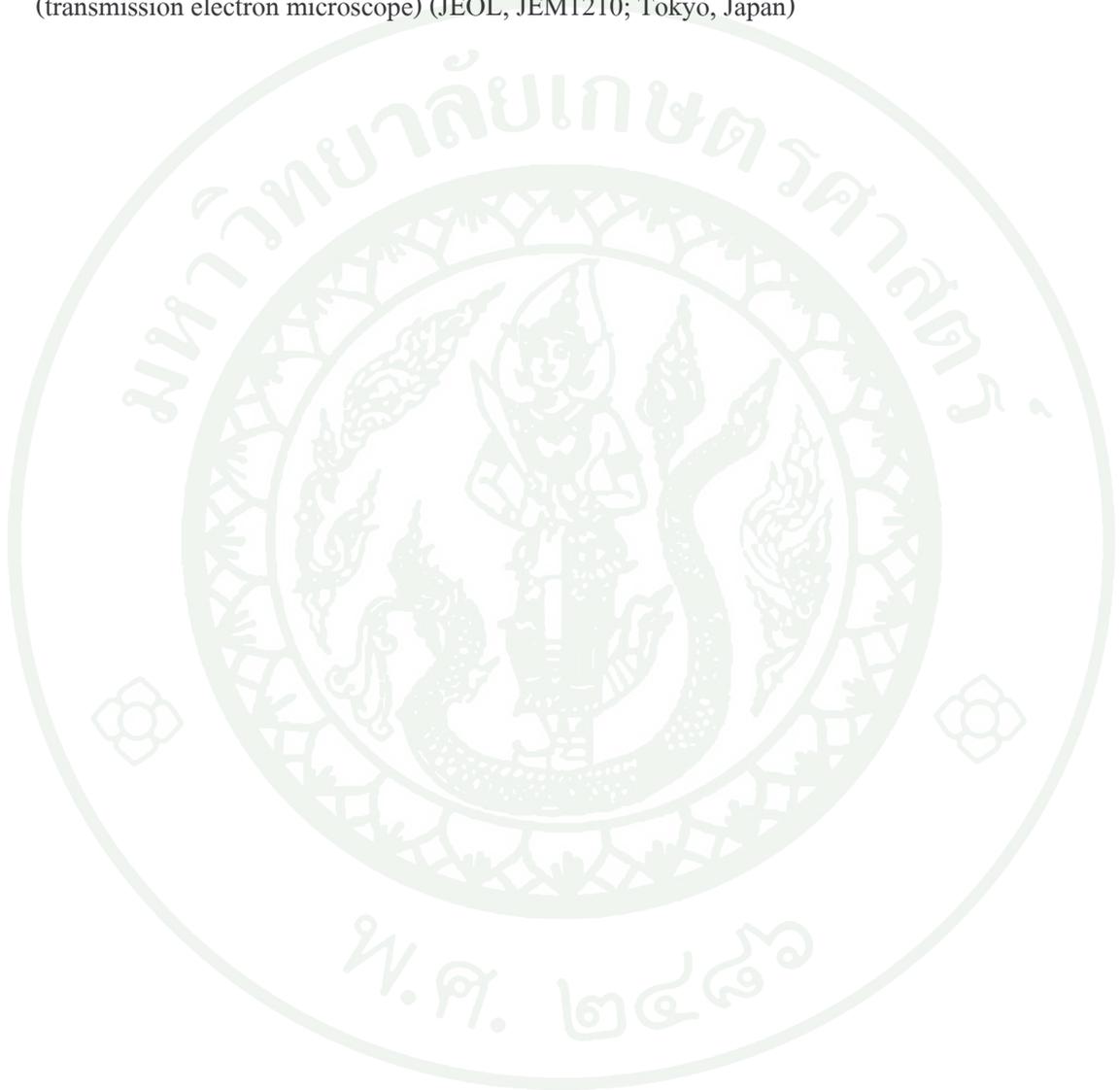
6. Staining

6.1 นำ semithin sections ย้อมสีด้วย toluidine blue และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงก่อน เพื่อหาตำแหน่งที่ต้องการจะนำไปตัด ultrathin sections

6.2 นำ ultrathin sections ย้อมสีด้วย uranyl acetate และ lead citrate ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ คือ

6.2.1 uranyl acetate เข้มข้น 2% จนถึงอิมมัตวีนน้ำกลั่นหรือใน 50% ethanol วิธี การคือหยดสีลงบน parafilm 1 หรือ wax paper ทำให้คงตัวเป็นหยดไม่กระจายตัวออกไป คว่ำกริด ด้านที่มี section ลงบนหยดสีดังกล่าว นาน 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ข้อควรระวังคือ แสงทำให้ uranyl acetate ตกตะกอนได้ ดังนั้นจึงควรใช้ภาชนะปิดกันแสง ขวดที่เก็บสารควรหุ้มไม่ให้แสงเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ เมื่อย้อมครบตามเวลา ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ไม่ให้สีหลงเหลืออยู่ เพื่อป้องกันการเกิดตะกอน ซับพอหมาดแล้วย้อมต่อด้วย lead citrate

6.2.2 lead citrate ซ้อมนาน 5-15 นาที วิธีการซ้อมเช่นเดียวกับ uranyl acetate แต่ต้องทำในภาชนะที่ปิดสนิท และมีสารดูด CO_2 เช่น เกล็ด NaOH บรรจุด้วย เนื่องจาก lead citrate จะทำปฏิกิริยากับ CO_2 เกิดตะกอน lead carbonate ขึ้น เมื่อซ้อมครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว จุ่มล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ซับให้แห้ง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope) (JEOL, JEM1210; Tokyo, Japan)





ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทาง SEM

1. Fixation

- 1.1 นำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ต้องการมาตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ ขนาด 1 ลูกบาศก์ มิลลิเมตร
- 1.2 นำตัวอย่างทั้งหมดมา pre-fix ด้วย 3% glutaraldehyde ใน buffer 0.1 M potassium phosphate pH 7.2 fix 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 1% osmium tetroxide ในน้ำกลั่นนาน 1-2 ชั่วโมง
- 1.5 ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 10-30 นาที

2. Dehydration

- 2.1 นำเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการ dehydration โดยผ่าน graded series of ethanol ซึ่งจะแทนที่น้ำในตัวอย่างด้วย ethanol เข้มข้น 50%, 70%, 80%, 95% และ 99.9% โดยในแต่ละความเข้มข้นใช้เวลา 10-15 นาที

3. Drying

ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการ fixation และ dehydration จะแช่อยู่ใน absolute ethanol ซึ่งถือว่าเป็น intermediate fluid ขั้นตอนนี้เป็นการจัดเอาของเหลวที่อยู่ในเนื้อเยื่อออกให้หมดโดยวิธี critical point drying (CPD) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

- 3.1 นำตัวอย่างมาใส่ไว้ในช่องใส่ตัวอย่างของเครื่อง CPD (CPD chamber) แล้วเติม ethanol ให้ท่วมตัวอย่าง

3.2 ปิดฝาช่องใส่ตัวอย่างให้สนิท ทำให้อุณหภูมิในช่องใส่ตัวอย่างเย็นลง (cool chamber)

3.3 ค่อย ๆ เติมคาร์บอนไดออกไซด์เหลวลงไปในช่องใส่ตัวอย่าง ปล่อยให้เกิดกระบวนการแทนที่ ethanol โดยคาร์บอนไดออกไซด์เหลวจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

3.4 ปรับความดันและอุณหภูมิภายในช่องใส่ตัวอย่างให้สูงขึ้นจนถึงจุดวิกฤติ (ประมาณ 40 องศาเซลเซียส)

3.5 ปล่อยให้ก๊าซถูกกำจัดออกไปจากช่องใส่ตัวอย่างจนหมด ตัวอย่างจะแห้ง และมีโครงสร้างที่เหมือนเดิม หรือใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด

4. Mounting

เป็นการติดตัวอย่างบนแท่นติดตัวอย่าง (stub) ซึ่งเป็นโลหะประเภททองเหลือง โดยใช้ carbon tape

5. Coating

เป็นการฉาบผิวตัวอย่างด้วยทอง (gold หรือ Au) ภายใต้สภาวะที่เป็นสุญญากาศ และมีกระแสไฟฟ้าที่เหมาะสม ด้วยเครื่อง Ion sputtering device (รุ่น JFC-1100E)

6. SEM observation

ตัวอย่างที่แห้งและได้รับการฉาบผิวด้วยทองเรียบร้อยแล้ว สามารถนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องกราด (scanning electron microscope หรือ SEM) รุ่น JEOL ISM-5300



การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

1. วิธีการ fixed ตัวอย่าง

นำตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วย fixed ในน้ำยา Davidson's fixative โดยให้น้ำยามี ปริมาตรประมาณ 10-20 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ ซึ่งวิธีการ fixed จะขึ้นอยู่กับขนาดของกุ้ง ดังนี้คือ

1.1 กุ้งระยะ post-larvae แช่ลงไป ในน้ำยา fixed ทั้งตัว

1.2 กุ้งขนาดน้อยกว่า 2 กรัม จะฉีดน้ำยาเข้าบริเวณตับและตับอ่อนด้วยเข็มฉีดยาขนาด 0.45x31 M/M และฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณท้องด้วย แล้วจึงแช่ลงในน้ำยา fixed ทั้งตัว

1.3 กุ้งขนาด 2-12 กรัม จะฉีดน้ำยาเข้าบริเวณตับและตับอ่อน และฉีดเข้ากล้ามเนื้อท้อง บริเวณปล้องที่ 1 และปล้องที่ 5 ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 0.65x33 M/M และในกุ้งที่มีขนาดใหญ่เกินกว่า 12 กรัม ควรตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ตัดบริเวณรอยต่อของส่วนหัวกับส่วนท้อง และส่วนท้อง ระหว่างปล้องที่ 3 กับ 4 ก่อนแช่ลงในน้ำยา fixed

ปริมาตรน้ำยาที่ฉีดเข้าตัวอย่างประมาณ 0.1-10 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับขนาดของกุ้ง จากนั้นนำ ตัวอย่างกุ้งดังกล่าวมาแช่ในน้ำยา Davidson's fixative ประมาณ 24-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายไป เก็บไว้ในเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเตรียมตัวอย่างขั้นต่อไป

2. การเตรียมสารเคมีเพื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.1 Davidson's fixative (Bell and Lightner, 1988)

95% ethyl alcohol	330.0	ml
100% formalin (formaldehyde 37-39%)	220.0	ml
50% HCl (V/V)	115.0	ml
น้ำกลั่น	335.0	ml
เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

2.2 Hematoxylin และ Eosin (H&E)

2.2.1 การเตรียม Mayer's hematoxylin

hematoxylin crystals	1.0	g
sodium iodate	0.8	g
potassium or ammonium alum	200.0	g
citric acid	1.0	g
chloral hydrate	200.0	g
น้ำกลั่น	2,000.0	ml

ละลาย alum ในน้ำกลั่น แล้วเติม hematoxylin ลงไป คนให้ละลาย จึงเติม sodium iodate ผสมให้เข้ากัน เติม citric acid และ chloral hydrate คนให้เข้ากัน เขย่าจนสารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ได้สีแดงอมม่วง (red-dish violet) ควรทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้

2.2.2 การเตรียม Eosin

eosin Y, CI 45380	0.9	g
35% ethyl alcohol	300.0	ml
glacial acetic acid	1.5	ml

ผสมเข้าด้วยกัน แล้วเติม glacial acetic acid 2-3 หยดก่อนใช้

3. วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา

3.1 การเตรียมชิ้นเนื้อในกึ่งขนาดเล็กจะใช้กึ่งทั้งตัว ห่อด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ส่วนในกึ่งขนาดใหญ่จะตัดเฉพาะส่วนที่ต้องศึกษา ได้แก่ อวัยวะในระบบท่อหุ้มร่างกาย 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

3.3 จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างวางในแม่พิมพ์ (mold) เพื่อทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน โดยเครื่อง parafin embedding (Shandon Histocentre Z)

3.4 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้ มาตัดแต่งหน้าให้เรียบ

3.5 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome รุ่น Leica RM-2145) ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมโครเมตร ใช้ปากคีบปลายแบนคีบเนื้อเยื่อที่ตัดได้วางลงบนแผ่นสไลด์ ใช้หลอดหยด 1.5% ethanol ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อที่ตัดแล้ว หลังจากนั้นนำไปลอยบนน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 35-45 องศาเซลเซียส เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วซ้อนด้วยแผ่นสไลด์นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (warmer plate) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมงถึงตลอดคืน

3.6 เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วนำมาข้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธี Bell and Lightner (1988) ตามขั้นตอนดังนี้คือ

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)	จุ่ม 10-20 ครั้ง
11	ล้างน้ำ	1
12	95 % alcohol	จุ่ม 10-20 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
ไซโทพลาซึม-ติดสีชมพูถึงแดง

3.9 เนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วนำมาย้อมสี Giemsa ตามวิธี Wolbach' Giemsa (1922) ตามขั้นตอน
ดังนี้ คือ

fix ตัวอย่างด้วยน้ำยา Davidson's AFA, 10% buffered neutral formation หรือ Zenker's ตัด
เนื้อเยื่อ หนา 4-6 ไมโครเมตร

สารละลาย

สารละลาย Giemsa (stock)

Giemsa power	1.0	กรัม
Glycerin	66.0	มิลลิลิตร
Methyl alcohol	66.0	มิลลิลิตร

ผสม glycerin และ Giemsa powder นำไปอบที่ความร้อน 60 °C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม
methyl alcohol 66 มิลลิลิตร

สารละลาย Giemsa (working)

สารละลาย Giemsa (stock)	1.25	มิลลิลิตร
Methyl alcohol	1.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

สารละลาย rosin alcohol (stock)

Rosin, white	10.0	มิลลิลิตร
Alcohol 100%	100.0	มิลลิลิตร

สารละลาย rosin alcohol (working)

สารละลาย rosin (stock)	5.0	มิลลิลิตร
Alcohol 95%	40.0	มิลลิลิตร

วิธีการย้อม

1. deparaffinize และหยุดด้วยน้ำกลั่น
2. กำจัด mercuric chloride crystals ด้วย iodine และทำให้ตัวอย่างใสด้วย sodium thiosulfate

ถ้าน้ำยาที่ fix ตัวอย่างมีส่วนประกอบของ mercuric chloride ซึ่งจะสามารถสังเกตเห็นได้ โดยเนื้อเยื่อตัวอย่างจะเป็นสีน้ำตาลถึงสีดำ หรือเรียกว่า “Zenker crystal” สามารถกำจัดออกได้ดังนี้

- deparaffinize และหยุดด้วยน้ำกลั่น
 - นำสไลด์ใส่ใน Gram's หรือ Lugol's iodine นาน 15 นาที
3. ล้างโดยให้น้ำไหลผ่านนาน 15 นาที
 4. ล้างด้วยน้ำกลั่น
 5. แช่ในสารละลาย Giemsa ทิ้งไว้ 1 คืน
 6. differentiate ในสารละลาย rosin alcohol จนกระทั่งเนื้อเยื่อเป็นสีม่วงชมพู โดยนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์
 7. dehydrate ใน absolute alcohol และแช่ใน xylene (หรือ hemo de) 2 ครั้ง
 8. mount สไลด์ด้วย permount หรือ histoclad

ผล

นิวเคลียส – ติดสีน้ำเงิน

collagen และ เนื้อเยื่ออื่นๆ – ติดสีแดงชมพู

rickettsia – ติดสีม่วง

bacteria – ติดสีน้ำเงิน

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นายสาธิต ประเสริฐศรี
เกิดวันที่	23 มกราคม 2524
สถานที่เกิด	อำเภอเสนา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
ประวัติการศึกษา	วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง)
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงาน	คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

