ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง ชีววิทยาประมง

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การปนเปื้อนและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในผลิตภัณฑ์กุ้งขาวแวนนาไม
แช่แข็งถอดหัวปอกเปลือก

Contamination and Transmission of Viruses in Pacific White Shrimp *(Litopenaeus vannamei)* Headless Shell-less Frozen Product

นามผู้วิจัย นางสาวจิตรา บุญยงค์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปนเปื้อนและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในผลิตภัณฑ์กุ้งขาวแวนนาไม แช่แข็งถอดหัวปอกเปลือก

Contamination and Transmission of Viruses in Pacific White Shrimp *(Litopenaeus vannamei)* Headless Shell-less Frozen Product

โดย

นางสาวจิตรา บุญยงค์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จิตรา บุญยงค์ 2554: การปนเปื้อนและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในผลิตภัณฑ์กุ้งขาวแวนนาไมแช่แข็งถอดหัวปอกเปลือก ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D. 69 หน้า

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส 5 ชนิด ได้แก่เชื้อไวรัสทอร่า (Taura syndrome virus:TSV) เชื้อไวรัสดวงขาว (White spot syndrome virus:WSSV) เชื้อไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus:YHV) เชื้อไวรัสตัวพิการ (Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus:IHHNV) และเชื้อไวรัสหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Macrobranchium rosenbergii* nodavirus: *Mr*NV) จากผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งถอดหัวปอกเปลือกไปสู่กุ้งปกติในห้องปฏิบัติการโดยสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุ้งดังกล่าวจากสมาคมอาหารแช่เหยือกแข็งไทยทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ.2552 แล้วนำมาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโดย วิธี nested PCR สำหรับเชื้อ WSSV และ IHHNV และวิธี RT-PCR สำหรับเชื้อ YHV TSV และ *Mr*NV ผลการศึกษาพบการติดเชื้อ TSV จำนวน 9 ตัวอย่าง เชื้อ WSSV 8 ตัวอย่าง เชื้อ IHHNV 7 ตัวอย่าง เชื้อYHV และเชื้อ *Mr*NV พบจำนวนเท่ากันคือ ชนิดละ 4 ตัวอย่าง แล้วนำตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสดังกล่าวไปให้กุ้งปลอดเชื้อ ขนาด 10-12 กรัมกินแล้วทำการตรวจสอบอัตราการตายและการติดเชื้อไวรัส โดยวิธี nested-PCR และ RT-PCR เป็นเวลา14 วันผลการศึกษาไม่พบการตายของกุ้งและไม่พบการติดเชื้อไวรัสในทุกกลุ่มการทดลอง การศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตกุ้งแช่แข็ง(ถอดหัวปอกเปลือก)ในการลดความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ โดยนำกุ้งปลอดเชื้อขนาด 10-12 กรัมจำนวน 10 ตัวต่อโรค 1 ชนิด มาฉีดเชื้อ TSV, YHV,WSSV, IHHNV และ *Mr*NV เข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อ หลังจากนั้นสังเกตอาการ กุ้งที่ใกล้ตายจะถูกนำไปเป็นอาหารให้กับกุ้งปกติขนาด 10-12 กรัม จำนวน 10 ตัวต่อตู้ ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 2 วัน โดยแต่ละโรคจะใช้ตู้การทดลอง 3 ตู้ หลังจากกุ้งทดลองได้รับเชื้อเป็นเวลา 3 วันจะนำกุ้งทั้งหมดแช่น้ำแข็งแล้วขนส่งไปยังโรงงานแปรรูป (ใช้เวลา 2 ชั่วโมง) ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปตามมาตราฐานของโรงงานแปรรูปจากนั้นเก็บตัวอย่างกุ้ง 20 ตัวต่อโรค (ในระหว่างกระบวนการแปรรูป 10 ตัวและหลังเสร็จกระบวนการแปรรูป 10 ตัว) แล้วนำไปให้กุ้งปกติกิน 2 มื้อต่อวัน เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบอัตราการตายและการติดเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ IHHNV, TSV YHV และ *Mr*NV ไม่พบการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวทั้งในกลุ่มที่เก็บระหว่างการแปรรูปและ กลุ่มที่แปรรูปเสร็จแล้ว ในทางตรงกันข้ามกุ้งทดลองที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ทั้งหมด แสดงอาการของโรคและพบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ จึงทำการศึกษาการติดเชื้อ WSSV อีกครั้ง โดยปฏิบัติตามขั้นตอนทั่วไปของฟาร์มเลี้ยงกุ้งในการจับและขนส่งกุ้งไปยังโรงงานแปรรูปทุกประการซึ่งปกติแล้วขั้นตอนทั้งหมดจะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง โดยนำกุ้งที่ติดเชื้อWSSV มาให้กุ้งปลอดเชื้อจำนวน 30 ตัวกินจนกุ้งดังกล่าวแสดงอาการของโรค จากนั้นนำกุ้งทดลองทั้งหมดมาแช่ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างด้วยคลอรีน 50 พีพีเอ็ม ก่อนที่จะใส่ภาชนะบรรจุน้ำแข็ง ทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง แล้วขนส่งตัวอย่างทั้งหมดไปแปรรูปตามกระบวนการแปรรูปของโรงงานดังที่กล่าวมาข้างต้น ตัวอย่างกุ้งทั้งหมดถูกนำไปให้กุ้งปลอดเชื้อในตู้ทดลองกินแล้วตรวจสอบการติดเชื้อและอัตราการตายเป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่ากุ้งทดลองทั้งกลุ่มที่ให้กินผลิตภัณฑ์ระหว่างแปรรูปและกลุ่มที่กินผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปเสร็จแล้วไม่พบการตายและไม่พบการติดเชื้อWSSV การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าถ้าทำการจับกุ้งและขนส่งตามวิธีการปกติของเกษตรกรก่อนที่จะผ่านกระบวนการแปรรูปของโรงงาน จะสามารถป้องกันการถ่ายทอดเชื้อWSSV ได้

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Jittra Boonyoung 2011: Contamination and Transmission of Viruses in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Headless Shell-less Frozen Product. Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Assistant Professor Niti Chuchird, Ph.D. 69 pages.

Series of studies were carried out to determine the transmission of five major viruses including ; Taura syndrome virus(TSV), white spot syndrome virus(WSSV), yellow head virus(YHV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus(IHHNV) and *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus(MrNV) from headless and shell-less frozen shrimp product to normal shrimp in laboratory conditions. One hundred randomly sampled products were obtained from Thai Frozen Foods Association between June to October 2009 and tested for viral infection using nested polymerase chain reaction (nested PCR) for WSSV and IHHNV and reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) assays for TSV, YHV and *Mr*NV. Results showed that 9 samples gave TSV-positive followed by WSSV with 8 samples, IHHNV with 7 samples for YHV and *Mr*NV with 4 samples each. All positive samples were then fed to the viruses-free shrimp of 10-12 g. in aquaria. They were monitored for mortality and checked for viral infection by nested-PCR and RT-PCR assays. At the end of 14-day experiment, no mortality was found. In addition, nested-PCR and RT-PCR tests gave negative results for all of the experimental shrimp. To study the efficiency of the frozen shrimp process (headless and shell-less) that can control the transmission of viruses infection to normal shrimp in laboratory. Ten viruses-free shrimp(10-12 g.) were infected with the virulent stock of each virus including TSV, YHV, WSSV, IHHNV and *Mr*NV and then placed in aquaria to observe clinical signs of disease. Moribund shrimp were then fed to 10 normal shrimp of 10-12 g. twice daily in each aquaria with three aquaria for each virus. On the third day post-challenge, shrimp were collected and placed on ice and transported to processing plant(2hours) before being processed according to standard procedures. 20 shrimp were sampled (10 during processing, another 10 at the end of the process) and fed directly to normal shrimp twice daily for three days. The challenged shrimp were observed for mortality for 7 days before being collected and tested for the presence of viruses using nested PCR and RT-PCR assays. The results showed that challenged shrimp with IHHNV, TSV ,YHV and *Mr*NV were all negative by nested PCR and RT-PCR methods. There was no mortality over 7 days regardless of whether shrimp fed with unfinished product or after processed product. In contrast, all tested shrimp fed with WSSV –product showed typical gross signs of the disease and were positive for nested PCR assay. WSSV-trail was carried out again using similar procedure practices for most farms for harvesting and transporting to the processing plants. The entire process usually consume 18-24 hours. WSSV infected shrimp were fed to 30 viruses-free shrimp until shrimp developed diseased signs. Experimental shrimp were collected and placing into ice water of 0-4 ^{o}C for 30 minutes. Then shrimp were washed in 50ppm chorine water before placing on ice in the container. Eighteen hours later shrimp were transported to the processing plant for processed as previously described. These samples were then fed to normal shrimp in aquaria and observed for 7 days. Results showed that shrimp fed with unfinished-product or finished product did not show mortality and negative for nested PCR. This results indicated that if shrimp were harvested and followed normal practices before processed with the industry standard at the processing plant. WSSV is unlikely to cause the disease.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิติ ชูเชิด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.ชลอ ลิ้มสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วง ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณดร.เต็มดวง สมศิริ และ ดร.พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการตรวจตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณสมาคมผู้ส่งออกสินค้าแช่เยือกแข็งไทย ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุ้งสดแช่เยือกแข็งในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณครอบครัว เพื่อน และพี่น้องจากศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่ช่วยเหลือและคอยให้คำปรึกษาตลอดมา

จิตรา บุญยงค์

เมษายน 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	32
สรุปผลการศึกษา	52
ข้อเสนอแนะ	53
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	54
ภาคผนวก	66
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	69

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยในเดือนมิถุนายน 2552	34
2	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยใน เดือนกรกฎาคม 2552	36
3	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยใน เดือนสิงหาคม 2552	37
4	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยในเดือนกันยายน 2552	38
5	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยในเดือนตุลาคม 2552	39
6	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกจากโรงงานแปรรูปที่เป็นสมาชิกของสมาคมอาหารแช่เหยือกแข็งไทยทั้ง 5 โรงงานตลอดระยะการศึกษา (5 เดือน)	40
7	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสสำคัญทั้ง 5 ชนิดในตัวอย่างกุ้งที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกจากสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย	41
8	แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสในตัวอย่างกุ้งปกติที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสสำคัญทั้ง 5 ชนิดก่อนนำ ไปให้กุ้งปกติกินแล้วผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกในโรงงานแปรรูป	43
9	แสดงผลการตรวจการติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากกุ้งปกติที่กินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสแล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกในห้องปฏิบัติการ	46

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	แสดงผลการตรวจการติดเชื้อไวรัสดวงขาว (WSSV) จากกุ้งปกติที่กินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสแล้วแช่น้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ	49

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกตามมาตรฐานของสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย	27
2	แสดงผลการตรวจโรคไวรัสทั้ง 5 ชนิดในกุ้งปกติที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัว ผ่าไส้และปอกเปลือกที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากโรงงานแปรรูป	42
3	แสดงผลตรวจการติดเชื้อไวรัสหลังจากให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจากการฉีดเชื้อไวรัสสำคัญทั้ง 5 ชนิด ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกพบว่ากุ้งตัวอย่างในแต่ละกลุ่มที่ทำการตรวจมีการติดเชื้อไวรัส	45
4	แสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส YHV และ GAV จากการให้กุ้งปกติ กินกุ้งที่ผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และ ปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ M = molecular marker, 1 ถึง 6 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ YHV แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50ppm , 7 ถึง 12 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ YHV แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย	47
5	แสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส WSSV จากการให้กุ้งปกติ กินกุ้งที่ผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ M = molecular marker, 1 ถึง 6 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วนำไปผ่านขบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50ppm , 7 ถึง 12 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย	48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
6	แสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส WSSV จากการให้กุ้งปกติ กินกุ้งที่แช่น้ำไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และ ปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ M = molecular marker, 1 ถึง 3 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50ppm , 4ถึง 5 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย	49

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปนเปื้อนและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในผลิตภัณฑ์กุ้งขาวแวนนาไม แช่แข็งถอดหัวปอกเปลือก

Contamination and Transmission of Viruses in Pacific White Shrimp *(Litopenaeus vannamei)* Headless Shell-less Frozen Product

คำนำ

ประเทศไทยเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกกุ้งของโลกโดยในปี พ.ศ.2553 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้งได้ประมาณ 640,000 ตัน และส่งออกประมาณ 400,000 ตัน โดยประเทศผู้ซื้อที่สำคัญของไทย ได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น กลุ่มสหภาพยุโรป จีน เกาหลี และออสเตรเลีย เป็นต้น (สมาคมกุ้งไทย, 2554) และถึงแม้ว่าประเทศไทยจะสามารถรักษาความเป็นผู้นำด้านการส่งออกกุ้งมาได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลากว่า 10 ปี แต่ที่ผ่านมาอุตสาหกรรมกุ้งของไทยต้องผ่านอุปสรรคต่างๆ มากมาย ไม่ว่าจะเป็นปัญหาโรคระบาดต่างๆ ทั้งโรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow head disease) โรคดวงขาว (White spot disease) โรคไวรัสตัวพิการ (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis disease) โรคไวรัสทอร่า (Taura disease) (Flegel, 2006) และโรคไวรัสกล้ามเนื้อขาวขุ่นที่ระบาดในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (White tail disease) (ศุภมาศ, 2549; Yokanandhan, 2006) หรือปัญหาเกี่ยวกับมาตรการกีดกันทางการค้า ไม่ว่าจะเป็นมาตรการการกีดกันด้านภาษี การตรวจยาหรือสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์กุ้ง (ชลอและพรเลิศ , 2547)

ปัจจุบัน องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health, OIE) ได้จัดทำข้อกำหนดสุขภาพสัตว์น้ำ (Aquatic Animal Health Code) ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานสุขภาพสัตว์น้ำระหว่างประเทศ เพื่อให้หน่วยงานทางสัตวแพทย์หรือหน่วยงานที่รับผิดชอบด้านมาตรการสุขภาพสัตว์นำมาใช้กำหนดกฎระเบียบด้านสุขภาพสัตว์ และยึดถือปฏิบัติเป็นมาตรฐานเดียวกัน โดย OIE(2008) ได้กำหนดโรคกุ้งในบัญชีโรคโดยระบุในข้อกำหนดสุขภาพสัตว์น้ำจำนวน 12 โรค และได้ออกข้อกำหนดการนำเข้าและส่งออกกุ้งแยกตามโรคต่างๆ ทั้งนี้ยังได้กำหนดรายการสินค้าที่ปลอดภัย (Safe commodities) สำหรับการนำเข้าแยกเป็นรายโรค ซึ่งรายการสินค้าดังกล่าวถือว่าเป็นสินค้าที่มีความปลอดโรคสูง ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าสินค้าที่อยู่ในรายการสินค้า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปลอดภัยดังกล่าวสามารถนำสินค้าเข้าได้โดยไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงสถานะของโรคของประเทศคู่ค้าว่าปลอดจากโรคหรือไม่ แต่สำหรับประเทศไทยนั้นพบว่าไวรัสที่สำคัญของ OIE หลายโรคได้แก่ โรคไวรัสทอร่า โรคไวรัสดวงขาวโรคไวรัสหัวเหลืองโรคไวรัสตัวพิการ และโรคไวรัสกล้ามเนื้อขาวขุ่นที่ระบาดในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: *Mr*NV) ทำให้สินค้ากุ้งของประเทศไทยถูกจัดอยู่ในกลุ่มสินค้าที่มีความเสี่ยงต่อการนำโรคดังกล่าวด้วย จนทำให้ประเทศผู้ซื้อบางประเทศใช้มาตรการดังกล่าวในการกีดกันการนำเข้าสินค้ากุ้งจากประเทศไทย

สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการปนเปื้อนและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่สำคัญ 5 ชนิดได้แก่ โรคหัวเหลือง โรคดวงขาวโรคไวรัสตัวพิการ โรคไวรัสทอร่า และโรคไวรัสกล้ามเนื้อขาวขุ่นที่ระบาดในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวปอกเปลือกของไทย ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประเทศไทยส่งออกมากที่สุด โดยทำการสุ่มตรวจโรคทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งดังกล่าวจำนวน 100 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือน มิถุนายนถึง เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552 นอกจากนี้ยังทำการศึกษาโอกาสของผลิตภัณฑ์กุ้งที่ปนเปื้อนไวรัสดังกล่าวว่าสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการได้หรือไม่ โดยผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญๆ ที่จะนำไปเสนอให้ OIE พิจารณาเพื่อปรับปรุงมาตรการในการควบคุมสินค้าที่มีความเสี่ยงต่อการนำโรค เป็นการเพิ่มศักยภาพการแข่งขันของอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยให้สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้อย่างมั่นคงต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการปนเปื้อนและการถ่ายทอดเชื้อไวรัส 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวปอกเปลือกแช่แข็งของไทย

2. เพื่อศึกษาโอกาสในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวปอกเปลือกแช่แข็งของไทยไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการในการผลิตกุ้งแช่แข็ง ซึ่งเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้ปอกเปลือกในการลดความสามารถในการติดเชื้อไวรัสโรคกุ้งทั้ง 5 ชนิด ในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

โรคไวรัสที่สำคัญที่พบระบาดในการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทยและมีโอกาสพบในผลิตภัณฑ์กุ้งของไทย จำนวน 5 โรคตามบัญชีขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organization for Animal Health) (OIE, 2008) ได้แก่ Taura syndrome virus:TSV , White spot syndrome virus:WSSV, Yellow head virus:YHV, Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus: IHHNV, *Macrobranchium rosenbergii* nodavirus: *Mr*NV สำหรับข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับลักษณะทั่วไปของโรคแต่ละชนิดจากเอกสารต่างๆ มีรายละเอียดดังนี้

1. โรคทอร่า

ลักษณะทั่วไปของโรค

โรคทอร่า มีรายงานครั้งแรกในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม บริเวณปากแม่น้ำTaura ประเทศเอกวาดอร์ในปี ค.ศ.1992 (Jimenez, 1992) สำหรับในทวีปเอเชียมีการระบาดในปี พ.ศ.2545 (Flegel *et al.* , 2003) โรคชนิดนี้ทำความสูญเสียให้แก่ผู้เลี้ยงกุ้งเป็นจำนวนมากในหลายประเทศ ได้แก่ เอกวาดอร์ ในทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งเคยเป็นประเทศที่มีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมากที่สุดในช่วงก่อนที่จะมีโรคไวรัสดวงขาวระบาด กุ้งขาวแวนนาไมที่มีการนำไปเลี้ยงในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ก็มีรายงานการเกิดโรคทอร่า เช่น ในประเทศไต้หวัน และจีน เป็นต้น ในประเทศไทย โรคทอร่ามีรายงานจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมครั้งแรก ในช่วงเดือนเมษายนในปี พ.ศ. 2546 ในจังหวัดนครปฐม และฉะเชิงเทรา ทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นโรคที่มีการติดต่อแพร่กระจายไปบ่อเลี้ยงข้างเคียงได้ง่าย และเกษตรกรยังไม่รู้ว่ากุ้งที่ตายมีสาเหตุจากอะไร ดังนั้นการแก้ปัญหาเพื่อลดความรุนแรงหรือการป้องกันการแพร่กระจายของโรคในช่วงแรกๆ จึงยังไม่ค่อยได้ผล

สาเหตุของโรคและความรุนแรง

TSV เป็นไวรัส RNA ชนิดสายเดี่ยว (single strand RNA) ไม่มีผนังหุ้ม (nonenveloped) รูปร่างหลายเหลี่ยม (icosahedron) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 32 นาโนเมตร จัดอยู่ในกลุ่ม Pisconavirus (Brock *et al.* ,1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคที่มีสาเหตุจาก TSV แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือระยะเฉียบพลัน (acute) ระยะคาบเกี่ยว (transition) และระยะเรื้อรัง (chronic) แม้ว่าจะมีเพียงระยะเฉียบพลันและระยะคาบเกี่ยวที่มีการแสดงอาการของโรค (Lightner, 1996) อาการของกุ้งขาวแวนนาไมที่ใกล้ตายในระยะเฉียบพลันกุ้งจะมีลำตัวสีแดง แพนหางและขาว่ายน้ำแดง (บางครั้งเรียกโรคหางแดง) กุ้งอาจจะมีเปลือกนิ่ม ไม่มีอาหารในทางเดินอาหาร และมักจะตายระหว่างการลอกคราบ

ระยะคาบเกี่ยว (transition) ของการเกิดโรคจะเกิดขึ้นในช่วง 2-3 วัน จะพบเมลานินที่มีรูปร่างไม่แน่นอนกระจายอยู่ที่เปลือกกุ้ง กุ้งอาจจะมีเปลือกนิ่มหรือไม่นิ่ม และตัวแดง และอาจจะกินอาหารปกติ (Hasson *et al.*, 1995 ; Lightner, 1996) บริเวณที่พบเมลานินจะเป็นการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดสู่บริเวณเนื้อเยื่อใน cuticle epithelium หลังการลอกคราบกุ้งป่วยที่อยู่ในระยะคาบเกี่ยวก็จะเข้าสู่ระยะเรื้อรัง ในระยะนี้ไวรัสอาจจะยังคงอยู่ในต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) ตลอดไป TSV จะทำให้เกิดการติดเชื้อในเซลล์ของเนื้อเยื่อที่มีกำเนิดมาจากชั้น ectoderm และmesoderm โดยเฉพาะเนื้อเยื่อ cuticle epithelium จะเป็นส่วนที่มีการติดเชื้อรุนแรงที่สุดในระยะเฉียบพลันในขณะที่ lymphoid organ จะมีการติดเชื้อในระยะเรื้อรัง เท่านั้น

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

เมื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณ cuticle epithelium เซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้น sub-cuticle และเส้นใยของกล้ามเนื้อลายบริเวณใกล้เคียง อาจจะมีการติดเชื้อด้วยไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อจะติดสี eosinophil และเกิด pyknosis หรือ karyorrhexsis ของนิวเคลียส จะพบเศษของเซลล์ที่ตายเป็นจำนวนมากมีลักษณะเป็นก้อนกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-12 ไมโครเมตร ย้อมติดสี eosinophil หรือ basophil อ่อนๆลักษณะเหล่านี้ จะพบในระยะเฉียบพลันของการติดเชื้อเป็นลักษณะที่เรียกว่า “peppered” หรือ “buckshot-riddled” ซึ่งเป็นลักษณะที่เกิดขึ้นจำเพาะของโรคนี้แต่ไม่พบการตอบสนองในลักษณะของการอักเสบที่มี hemocytic infiltration ลักษณะนี้สามารถใช้ในการแยก TSV ในระยะเฉียบพลันออกจากระยะคาบเกี่ยวได้ (Lightner, 1996)

ในระยะคาบเกี่ยวจะพบความผิดปกติของชั้น cuticle น้อยลง แต่จะเกิด hemocytic infiltration และการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดบริเวณนั้นแทน การรวมกลุ่มของเม็ดเลือดจะทำให้เกิดเมลานินและจุดดำ (black spot) ซึ่งเป็นอาการเฉพาะของระยะคาบเกี่ยว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุ้งที่ติดเชื้อ TSV ในระยะเรื้อรังจะไม่แสดงอาการของโรค ลักษณะทางเนื้อเยื่ออย่างเดียวที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อคือ การเกิด lymphoid organ spheroids (LOS) ซึ่งเป็นการรวมกลุ่มของเซลล์ในลักษณะเป็นก้อนกลมบริเวณ intertubular space ลักษณะของ LOS ไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ TSV ได้ จะต้องมีการยืนยันด้วยเทคนิค in situ DNA hybridization (Mari *et al*., 1998) หรือ RT-PCR (Nunan and Lightner, 1997) เนื่องจากการเกิด LOS สามารถพบได้ในกุ้งที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ด้วย

จากการติดตามการระบาดของโรคไวรัสทอร่าในกุ้งขาวแวนนาไมพบว่า ความรุนแรงของโรคแต่ละครั้งและลักษณะอาการของกุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วยมีความแตกต่างกันมาก บางครั้งมีกุ้งตายมากอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 วัน จนต้องปิดบ่อ แต่บางครั้งมีกุ้งตายไม่มาก และสามารถประคับประคองให้เลี้ยงต่อไปได้จนจับขายและได้ผลผลิตตามปกติ เพื่อให้เกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมและนักวิชาการที่เกี่ยวข้องใช้เป็นแนวทางในการจัดการเพื่อแก้ปัญหาและลดความสูญเสียจากโรคไวรัสทอร่า นอกจากนี้ความรุนแรงของโรคไวรัสทอร่าจะรุนแรงมากในพื้นที่ที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ เกษตรกรจะต้องเข้าใจรายละเอียดของโรคไวรัสทอร่าในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งชลอและพรเลิศ (2547) ได้จำแนกตามความรุนแรงได้ 2 แบบดังนี้ คือ

1. ความรุนแรงต่ำกว่าเฉียบพลัน (subacute) เป็นโรคทอร่าที่พบในกุ้งขาวแวนนาไมที่มีอายุระหว่าง 20-40 วันเป็นส่วนใหญ่ แต่บางครั้งอายุกุ้งอาจจะน้อยกว่าหรือมากกว่านี้ก็สามารถพบได้ โรคทอร่าแบบนี้จะมีความรุนแรงไม่มากแต่จะมีกุ้งตายเรื่อยๆ กุ้งที่เป็นโรคจะพบตายตามขอบบ่อประปราย ในลักษณะเหมือนกุ้งปกติ บางตัวมีสีชมพูอ่อนบางตัวสีขาวขุ่นมากกว่ากุ้งปกติเล็กน้อย กุ้งที่เข้าไปในยอบางตัวมีสภาพที่อ่อนแอไม่ดีดตัวแรง ซึ่งตามปกติ ถ้ากุ้งขาวแวนนาไมไม่ป่วยเมื่อยกยอกุ้งจะดีดตัวหนีออกจากยอ จะเหลือกุ้งเพียงไม่กี่ตัวในยอ แต่ในกรณีที่กุ้งป่วยจะยังคงเหลือกุ้งในยอมากกว่าปกติ และมีสีเข้มขึ้นกว่ากุ้งปกติเล็กน้อย คือสีอมชมพูอ่อน

การแก้ปัญหา เมื่อพบว่ามีกุ้งขาวแวนนาไมป่วยตามลักษณะอาการที่กล่าวมาข้างต้น เก็บเอากุ้งป่วยตามขอบบ่อขึ้นมาทำลาย รวมทั้งลงไปตรวจดูตามรอบๆ แนวเลนกลางบ่อจะมีกุ้งตายบางส่วนที่มากองรวมกันจากความแรงของเครื่องให้อากาศ นำเอากุ้งตายพื้นบ่อทั้งหมดเท่าที่จะทำได้ขึ้นมาทำลาย ห้ามถ่ายน้ำหรือเติมสารเคมีใดๆ ลงไปในบ่อ เพราะถ้ามีการเปลี่ยนแปลงมากกุ้งอาจจะลอกคราบ จะมีกุ้งตายมากขึ้น กุ้งที่อ่อนแออยู่แล้วถ้าลอกคราบจะตายเพิ่มขึ้น งดอาหาร 1 วัน หรือลดอาหารอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ เติมเกลือแร่ลงไปในบ่อเพื่อเพิ่มอิออนที่สำคัญๆจะทำให้กุ้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แข็งแรงขึ้น ในกรณีที่น้ำความเค็มต่ำ 1-5 พีพีที หรือเติมน้ำเค็มเพิ่มความเค็มในบ่อ ระมัดระวังอย่าใช้อุปกรณ์ใดๆ ร่วมกับบ่ออื่น เช่น แหสุ่มน้ำหนักกุ้ง กะละมัง เป็นต้น เพราะอาจจะแพร่เชื้อไวรัสไปบ่ออื่นๆ ได้ง่าย เปิดเครื่องให้อากาศเต็มที่ เพื่อรักษาระดับออกซิเจน และคุณภาพน้ำให้อยู่ในระดับที่ดี กุ้งจะแข็งแรงขึ้น

หลังจากการจัดการตามที่กล่าวมานี้ พบว่า อัตราการตายจะลดลงเรื่อยๆ และสามารถเลี้ยงต่อไปได้จนจับขาย แต่ต้องระวังอย่าเร่งการเจริญเติบโตโดยการให้อาหารมากเกินไป กุ้งอาจจะเริ่มตายอีกคล้ายกับอาการครั้งแรกก็ได้

2. ความรุนแรงแบบเฉียบพลัน (acute) กุ้งที่ป่วยเป็นโรคไวรัสทอร่าประเภทนี้มักจะพบ ในบ่อที่มีกุ้งหนาแน่น อายุประมาณ 50-80 วัน กุ้งที่ป่วยบางตัวจะมีสีแดงหรือสีชมพูเข้ม ตับและตับอ่อนมักจะมีสีเหลืองกว่าปกติ เหงือกอาจจะบวม ระยะแรกจะไม่พบว่ามีกุ้งตายตามขอบบ่อ แต่จะมีกุ้งตายที่พื้นบ่อเป็นจำนวนมาก หลังจากนั้นประมาณ 2 วัน กุ้งที่ตายบางส่วนจะลอยขึ้นมาเต็มบ่อ และมีกุ้งตายตามขอบบ่อเพิ่มขึ้น กุ้งบางส่วนที่มีตัวสีแดงหรือสีชมพู จะมีแผลสีดำหรือน้ำตาลเข้มตามลำตัว เนื่องจากโรคไวรัสทอร่าแบบนี้จะมีกุ้งตายอย่างรวดเร็วและมีเป็นจำนวนมากในระยะ 3 วันแรก ดังนั้น เกษตรกรบางคนอาจจะตัดสินใจปิดบ่อ โดยใช้สารเคมีเช่น คลอรีนผงหรือไตรคลอร์ฟอนใส่ลงไปในบ่อเพื่อฆ่าเชื้อไวรัสและกุ้งที่อยู่ในบ่อทั้งหมด เพื่อป้องกันการแพร่กระจายไปบ่อที่อยู่ใกล้ๆ กัน ในกรณีที่กุ้งไม่หนาแน่นมาก การแก้ปัญหาอาจจะทำได้ ดังนี้

งดอาหาร 1 วัน หลังจากนั้นค่อยๆ ให้อาหาร เก็บกุ้งตายในบ่อขึ้นมาทำลายห้ามถ่ายน้ำปรับสภาพในบ่อให้ดีขึ้นตามที่ได้อธิบายมาแล้วในการแก้ปัญหาโรคไวรัสทอร่าแบบรุนแรงต่ำกว่าเฉียบพลัน ถ้าสภาพต่างๆ ในบ่อดีขึ้นกุ้งที่มีแผลตามลำตัวสีดำ อาจจะไม่ตาย และอาจต้องใช้เวลาประมาณ 20-30 วัน แผลสีดำเหล่านี้จะค่อยๆ จางหายไปหลังจากกุ้งที่แข็งแรงขึ้นและลอกคราบ 2-3 ครั้ง

จากที่กล่าวมาแล้วโรคไวรัสทอร่าทั้ง 2 แบบมีความแตกต่างกันมากในเรื่องของความรุนแรง ทั้งนี้อาจจะมาจากเชื้อไวรัสเป็นคนละสายพันธุ์ (strain) ความรุนแรงจึงแตกต่างกัน ถ้านำกุ้งป่วยจากโรคไวรัสทอร่าทั้ง 2 แบบไปตรวจโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ผลที่ได้จะเป็นบวกชัดเจนมาก เพื่อป้องกันความสูญเสียที่อาจจะเกิดขึ้นจากโรคไวรัสทอร่า เกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งขาวต้องหมั่นสังเกตดูว่ามีกุ้งป่วยหรือเริ่มตายมีลักษณะและอาการตามที่อธิบายมาหรือไม่จะได้แก้ปัญหาได้ทัน เพราะการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เลี้ยงกุ้งขาวอย่างหนาแน่นโดยเฉพาะทางภาคใต้มีการถ่ายเปลี่ยนน้ำมากตามผลผลิตและขนาดของกุ้งที่ต้องการเลี้ยง ในกรณีที่มีการระบายน้ำออกมาจากบ่อที่เป็นโรค โอกาสที่ผู้เลี้ยงกุ้งในแหล่งนั้นจะได้รับผลกระทบไปด้วยมีสูงมาก การเตรียมการป้องกันที่ดีคือมีบ่อพักน้ำอย่างพอเพียง และใช้น้ำจากบ่อพักน้ำที่มีการพักมาเป็นเวลานานแล้วไม่น้อยกว่า 14 วัน โอกาสที่กุ้งจะได้รับเชื้อไวรัสจะน้อยลง การเลี้ยงกุ้งขาวก็จะได้ผลตามที่ต้องการ

ในปัจจุบันที่มีกุ้งขาวที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ต้านทานโรคทอร่าได้ดีมากทำให้กุ้งที่ตายจากโรคทอร่าลดน้อยลงมาก

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยโรคไวรัสทอร่าสามารถทำได้โดยการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ แต่อย่างไรก็ตามบางระยะของโรคจำเป็นจะต้องมีการยืนยันด้วยเทคนิค dot blot และ *in situ* hybridization โดยใช้ DIG-labeled cDNA probe; immunohistochemistry หรือ วิธี RT-PCR โดยใช้ fragmentที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ TSV มีขนาด 231 bp (Nunan *et al*., 1998)

primer ที่ใช้คือ Sense: 5′ TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC 3′
Antisense: 5′ AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT 3′

2. โรคดวงขาว (White Spot Disease)

ลักษณะทั่วไปของโรค

โรคดวงขาว (ตัวแดงดวงขาว) ในกุ้ง *Penaeus japonicas* กุลาดำได้พบมีการระบาดในประเทศจีนและญี่ปุ่นตั้งแต่ปี พ.ศ.2536-2537 ในประเทศไทยเริ่มมีการระบาดของโรคชนิดนี้ตั้งแต่ปลายปีพ.ศ. 2537 ทางภาคตะวันออกที่จังหวัด ระยอง จันทบุรี ภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี ส่วนภาคใต้ฝั่งตะวันตกพบที่จังหวัดตรัง การระบาดของโรคดังกล่าวก่อให้เกิดการสูญเสียอย่างมาก โดยความรุนแรงของโรคและการสูญเสียที่เกิดขึ้นใกล้เคียงกับโรคหัวเหลืองที่เคยระบาดในกุ้งกุลาดำ ในปัจจุบันนี้โรคดวงขาวพบในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไมทุกพื้นที่ แต่ความรุนแรงขึ้นอยู่กับฤดูกาลและพื้นที่การเลี้ยง พบการระบาดของโรคมากในช่วงปลายปีตั้งแต่เดือนตุลาคมจนถึงสิ้นปีและช่วงต้นปีซึ่งอากาศหนาวเย็นจะมีการตายของกุ้งมากกว่าช่วงอื่นๆ (ชลอ, 2543; ชลอ และพรเลิศ, 2547) แต่ในบางปีที่มีปริมาณฝน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตกติดต่อกันมากกว่าปกติ เช่นในปี พ.ศ. 2549 โรคดวงขาวระบาดในพื้นที่การเลี้ยงภาคกลางตั้งแต่เดือนสิงหาคม ไวรัสดวงขาวทำความเสียหายต่อ อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลทั่วโลกมากที่สุด ลักษณะอาการของโรคที่เห็นได้ชัดคือ กุ้งที่เป็นโรคดวงขาวจะมีลักษณะจุดขาวหรือดวงขาวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1 – 2.0 มิลลิเมตรที่บริเวณใต้เปลือกโดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวและด้านข้างลำตัวส่วนหาง กุ้งที่เป็นโรคดวงขาวนี้จะว่ายอยู่บริเวณผิวน้ำหรือเกยขอบบ่อ ไม่มีแรงดีดตัว กินอาหารลดลง บางครั้งพบกุ้งที่มีอาการลอกคราบไม่ออกหรือลอกคราบแล้วเปลือกไม่แข็งตัว อัตราการตายของกุ้งหลังจากเกิดโรคขึ้นอยู่กับแหล่งเลี้ยงและฤดูกาล ในช่วงที่มีอากาศหนาวหรือฝนตกหนักติดต่อกันนานๆ ในฤดูมรสุมทางภาคใต้ อัตราการตายของกุ้งอาจสูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 4-5 วัน

สาเหตุของโรคและความรุนแรง

โรคดวงขาวมีสาเหตุจากไวรัส White Spot Syndome Virus (WSSV) เช่นเดียวกับโรคดวงขาวที่พบในกุ้งกุลาดำ และกุ้งทะเลชนิดอื่นๆ เกิดจากการติดเชื้อไวรัส White Spot Syndrome Virus (WSSV) มีรายงานการพบครั้งแรกในกุ้ง *P. japonicus* ที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น ปี ค.ศ. 1993 มีการตั้งชื่อไวรัสชนิดนี้ว่า Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) หรือ Rod-shaped nuclear virus of *P. japonicus* (RV-PJ) (Nakano *et. al.*,1994; Inouye *et. al.*, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จากประเทศจีน ไต้หวัน (Chou *et. al*, 1995, Wang *et. al*, 2000) เกาหลี (Kim *et. al*., 1998) อินเดีย (Karunasagar *et. al*., 1997; Karunasagar and Otta, 1998; Mohan *et. al*., 1998) และสหรัฐอเมริกา (Lightner , 1996) สำหรับประเทศไทยเริ่มมีการระบาดของโรคชนิดนี้ตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2537 (ชลอ, 2543) ไวรัส WSSV เป็นเชื้อไวรัสชนิดดีเอ็นเอสายคู่ (double strand DNA) ในวงศ์ Whispoviridae รูปร่างเป็นแท่ง มีความยาว 270-290 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 110-120 นาโนเมตร

การระบาดของโรคมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกับคุณภาพลูกกุ้งซึ่งขึ้นอยู่กับฤดูกาล แหล่งเลี้ยง ความเค็ม และการจัดการฟาร์ม ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้ประสบความสำเร็จนั้นยากมาก ทั้งนี้เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ทั้งหมดที่จับมาจากธรรมชาติ มีการติดเชื้อไวรัสดวงขาวสูงมาก โดยเฉพาะในฤดูมรสุมโอกาสแม่กุ้งติดเชื้อมีมากขึ้น การจะได้ลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อก็น้อยลงตามไปด้วย จากการรวบรวมข้อมูลจากบ่อเลี้ยงกุ้งในพื้นที่ต่างๆ จะพบว่าฤดูกาลการเลี้ยงที่เหมาะสมและพบปัญหากุ้งติดเชื้อไวรัสดวงขาวน้อยที่สุดคือ ช่วงเดือนมีนาคมจนถึงเดือนกันยายน ส่วนช่วงที่พบการระบาดของโรคไวรัสดวงขาวมากที่สุดคือ ตั้งแต่เดือนตุลาคม-ธันวาคม ต่อเนื่องไปจนถึงเดือนมกราคมของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปีถัดไป ส่วนในด้านของแหล่งเลี้ยงพบว่าในเขตพื้นที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำจะมีปัญหาเรื่องโรคระบาดน้อยกว่าพื้นที่ชายฝั่งทะเล และที่สำคัญคือระบบการป้องกันโรคหรือการจัดการฟาร์มเลี้ยงที่ต้องให้ความสนใจคือการจัดการพื้นบ่อ และคุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยงเป็นอย่างดี

การแพร่กระจายของเชื้อไวรัส WSSV พบว่า พ่อแม่พันธุ์กุ้งจากธรรมชาติก็มีการติดเชื้อไวรัส WSSV และสามารถที่จะส่งผ่านเชื้อไวรัสไปยังลูกกุ้งได้ ขึ้นอยู่กับแหล่งและฤดูกาลของการจับ (Hsu *et. al.*, 1999; Withyachumnarnkul, 1999; Withyachumnarnkul *et. al.*, 2003) สอดคล้องกับการศึกษาของ Lo *et. al*. (1997) ที่ได้ใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) พิสูจน์ว่าเซลล์ที่ติดเชื้อในเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งไม่ใช่ oocyte และ oocyte ที่ติดเชื้อไม่สามารถที่จะเจริญไปเป็นไข่ที่สมบูรณ์ได้ และในกรณีเดียวกันพบว่า เซลล์ของ sperm ก็ไม่ได้ติดเชื้อ แต่เซลล์ของเนื้อเยื่ออื่น ๆ (supporting tissue) มีการติดเชื้อ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าการถ่ายทอดเชื้อไวรัส WSSV จากพ่อแม่พันธุ์ไปยังลูกกุ้งเกิดขึ้นหลังจากมีการวางไข่แล้ว ไข่หรือลูกกุ้งอาจจะสัมผัสกับอนุภาคของไวรัสที่อยู่ภายนอกในของเหลวที่เกิดขึ้นในระหว่างการผสมพันธุ์ การติดต่อแบบ นี้น่าจะเป็นการติดต่อโดยผ่านทางรังไข่ (transovarial transmission) มากกว่าการติดต่อผ่านไข่ (transovum transmission) เนื่องจากผนังของเซลล์ไข่และกุ้งระยะนอเพลียสไม่สามารถที่จะให้โมเลกุลขนาดใหญ่ผ่านเข้าไปได้ ดังนั้นผนังเซลล์จึงมีส่วนช่วยป้องกันการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคไวรัสได้ นอกจากนี้เชื้อไวรัส WSSV สามารถแพร่ระบาดโดยทางน้ำและพาหะอื่น สอดคล้องกับการศึกษาของ Flegel *et. al*. (1997) ที่ศึกษาการระบาดของไวรัส WSSV พบว่า น้ำในบ่อเลี้ยงที่มีการระบาดของโรคไวรัส WSSV จะยังคงอยู่ในภาวะที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ประมาณ 4 วัน และจากการทดลอง co-habitation พบว่า เชื้อสามารถถูกถ่ายทอดโดยผ่านน้ำ จากพาหะที่ติดเชื้อไปยังกุ้งปกติได้ภายใน 24 ชั่วโมง (Kanchanaphum *et. al*., 1998; Supamattaya *et. al*., 1998)

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

เมื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัส WSSV โดยเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดจากชั้น ectoderm และ mesoderm ของกุ้งที่ใกล้ตาย ขนาดของนิวเคลียสใหญ่ขึ้นภายใน มี basophilic inclusion body ล้อมรอบด้วยโครมาติน โดยระยะเริ่มต้นที่ติดเชื้อไวรัสจะพบการเกิด Cowdry type-A inclusion ที่ติดสีแดงโดยมีช่องว่างใสล้อมรอบ แต่เมื่อโรคได้พัฒนาต่อไปจะพบว่า inclusion body ติดสีน้ำเงิน ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถสังเกตได้ในเนื้อเยื่อของเหงือก เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก (sub-cuticular epithelium) บริเวณเนื้อเยื่อที่พบ inclusion body จะไม่พบการตอบสนองแบบอักเสบต่อเชื้อไวรัสทั้งๆที่มีเนื้อเยื่อถูกทำลาย (Flegel *et al.* , 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวินิจฉัยโรค

โรคไวรัส WSSV สามารถวินิจฉัยได้โดยการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งโดยการย้อมสี H&E และมีวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจสอบโดยนำเนื้อเยื่อส่วนของเหงือกและใต้ชั้นเปลือกมา fix ด้วนน้ำยา Davidson ที่ดัดแปลง โดย Dr. Tim Flegel คือใช้ HCl แทน acetic acid และย้อมด้วยสี H&E จะเห็น inclusion body การทำ stained tissues squashes หรือ impression smears นอกจากนั้นยังสามารถใช้เทคนิค *In situ* hybridization เทคนิค Dot blot hybridization เทคนิค PCR และตรวจยืนยันผลการวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) หลังจากที่มีการพัฒนาของ DNA hybridization probe สำหรับ WSSV ในประเทศไทย(Wongteerasupaya *et al*., 1996) primer ได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ยังไม่มีการตีพิมพ์ (Kanchanaphum *et al*., 1998) จนกระทั่ง Kiatpathomchai *et al*. (2001) ได้รายงานวิธี one-step PCR โดยใช้ primer (136198F and 136429R) ซึ่งมีลำดับ amplicon ดังนี้

GTA CGG CAA TAC TGG AGG AGG TAC ATC CAC TGT TAC AAT GTC TTC CAT
CT CAT TAG GCT GGT CAC ATA CAT TGG GTA GTA AAC ACT GGG TAC AGA
TCA GGG AAC ATT TGC TAT CAC CAG TTT CTC CCT CCA CCA TCT TAA AGA
GTT TAA CGG GCG GTC TGA ATC TAT TAT CCA CCA CAG TAA ATT TTG AAT
CCT TGT CTA GTG CAA AGT C**CT TGT CCA TCT TAC ACA TCT CC**

3. โรคหัวเหลือง (Yellow-head Disease)

ลักษณะทั่วไปของโรค

โรคหัวเหลือง ทำความเสียหายแก่ผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 ในบริเวณที่มีการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาในระยะแรกๆ ได้แก่พื้นที่จังหวัด สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี ระยอง (ชลอ, 2534) และต่อมาโรคดังกล่าวทำความเสียหายอย่างรุนแรงในจังหวัดฉะเชิงเทรา จันทบุรี ตราด และบางจังหวัดทางภาคใต้ จนกระทั่งปี พ.ศ. 2536 ทุกจังหวัดที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีรายงานการเกิดโรคหัวเหลือง โรคชนิดนี้เรียกตามลักษณะของกุ้งที่ป่วยซึ่งมักจะอยู่ตามริมขอบบ่อ ลำตัวกุ้งมีสีซีด มองเห็นส่วนหัวมีสีเหลือง (ชลอ, 2534; Boonyaratpalin *et. al*., 1993; Chantanachookin *et. al*., 1993) เนื่องจากตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มีสีซีดเหลือง กุ้งที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลืองจะมีอายุตั้งแต่ 25 วันขึ้นไปจนถึงประมาณ 70 วัน โดยโรคหัวเหลืองที่เกิดกับกุ้งอายุ 25-35 วัน มีลักษณะคล้ายกับโรคตายเดือนหรือโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่ความรุนแรงจะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มากกว่า คือโรคตายเดือนเมื่อผสมยาปฏิชีวนะกับอาหารให้กุ้งกินร่วมกับการจัดการเรื่องคุณภาพน้ำและพื้นบ่อให้ดีขึ้น มักจะแก้ปัญหาได้ แต่กุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองนั้นพบว่ากุ้งตายอย่างรวดเร็วโดยใช้เวลา 2-3 วันกุ้งจะตายหมดบ่อ

สำหรับโรคหัวเหลืองที่เกิดกับกุ้งอายุประมาณ 50-70 วัน ก่อนที่จะเริ่มมีกุ้งตายพบว่าการกินอาหารของกุ้งในบ่อจะเพิ่มขึ้นมากติดต่อกันหลายวัน หลังจากนั้นจะเริ่มพบมีกุ้งตาย โดยอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา2-3 วัน กุ้งอาจตายหมดบ่อ เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรคที่ทำให้ความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกชนิด พบว่าโรคหัวเหลืองทำให้กุ้งตายรวดเร็วและรุนแรงมากที่สุด และการแพร่กระจายในพื้นที่การเลี้ยงแต่ละแหล่งจะรวดเร็วมาก ในระยะแรกๆ ที่มีการเลี้ยงกุ้งโดยใช้ระบบเปิดถ่ายน้ำบ่อยๆ หลังจากเกิดโรคหัวเหลืองจึงมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งมาเป็นระบบถ่ายน้ำน้อยลง หรือใช้ระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียน ทำให้การแพร่กระจายของโรคหัวเหลืองลดความรุนแรงลงไปและการแพร่กระจายไม่กว้างขวางมากเหมือนยุคแรกๆ

สาเหตุของโรคและความรุนแรง

โรคหัวเหลืองเกิดจากไวรัสหัวเหลือง (yellow-head virus) มีรายงานการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย (ชลอ,2534) และต่อมาได้มีการระบาดในกุ้งที่เพาะเลี้ยงในทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศเวียดนาม ฟิลิปปินส์ และอินเดีย (Limsuwan, 1991; Boonyaratpalin *et. al*., 1993; Chantanachookin *et. al*., 1993; Mohan *et. al*., 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานการระบาดในกุ้งที่เลี้ยงในแถบทวีปอเมริกา (Lightner *et. al*., 1997; Loh *et. al*., 1998)

เชื้อไวรัส YHV ซึ่งเป็น เชื้อไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single strand RNA) รูปร่างเป็นท่อน จัดอยู่ในสกุล Okavirus และอยู่ในวงศ์ Roniviridae และอันดับ (Order) Nidovirales (Cowley *et. al*., 2000; Mayo, 2002) เป็นไวรัสที่มีผนังหุ้ม (enveloped virus) รูปร่างเป็นท่อน (bacilliform) มีความยาว 150-200 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-50 นาโนเมตร (Nadala *et. al.,* 1997b)

เชื้อไวรัส YHV สามารถแพร่กระจายโดยทางน้ำและติดจากพาหะอื่นได้ทั้งจากการอยู่ร่วมกันหรือการกินกุ้งที่เป็นพาหะเข้าไป (horizontal transmission) ซึ่ง Flegel *et. al*. (1995) รายงานว่า เชื้อไวรัส YHV สามารถอยู่ในน้ำได้นานถึง 4 วัน โดยที่ยังสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

YHVได้ และจากข้อมูลล่าสุดพบว่าเชื้อไวรัส YHV สามารถถ่ายทอดผ่านรังไข่ของกุ้ง รวมทั้ง spermatophore ของกุ้ง (vertical transmission) (Cowley *et. al*., 2000)

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

เมื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส YHV พบการตายของเซลล์ที่มีกำเนิดจากชั้น ectoderm และ mesoderm เกิด basophilic cytoplasmic inclusion ติดสีน้ำเงินจากการย้อมด้วยสี H&E ซึ่งจะพบได้ชัดเจนในเหงือกและต่อมน้ำเหลือง

การวินิจฉัยโรค

การย้อมสีเม็ดเลือดของกุ้งสามารถใช้วินิจฉัยการเกิดโรคไวรัส YHV เบื้องต้นได้ ซึ่งจะพบว่าเม็ดเลือดของกุ้งที่ติดเชื้อจะพบการตายของเซลล์ในระยะต่าง ๆ เช่น การเกิด pyknotic และ karyorrhectic ของนิวเคลียส การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยการย้อมสี H&E และการทดลองการถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (bioassay) ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้วินิจฉัยโรคไวรัสชนิดนี้ได้ นอกจากนั้นสามารถตรวจสอบยืนยันการเกิดโรคไวรัส YHV ได้ด้วย วิธี RT-PCR (Wongteerasupaya *et. al*., 1997; Tang and Lightner, 1999) และวิธี *in situ* nucleic acid hybridization (Tang *et. al*., 2002) และการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน TEM (Boonyaratpalin *et. al*., 1993; Chantanachookin *et. al*., 1993)

ในปัจจุบันวิธีการวินิจฉัยโรคหัวเหลืองที่ดีที่สุด RT-PCR assay ซึ่ง primer อันแรกที่ถูกออกแบบขึ้นสำหรับโรคหัวเหลืองโดย Wongteerasupaya *et al.* (1997)

CCG CTA ATT TCA AAA ACT ACG ACA GAA ACA CCG GCATGT CCT GTT CTC TCA CTG AAT TCC AGC TCT CTC TCT CTC ACA TCC TCT ACC GTT CTG AAG CAC AGC GTA CTC CTG ACG ACTTCC TCG ACATAA CAC CTT

ชิ้นส่วนนี้ยังสามารถใช้เป็น lable สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี dot blot และ *in situ* hybridization แต่การเตรียมตัวอย่างไม่เหมือนกับวิธี RT-PCR ต่อมา Tang and Lightner (1999) ได้ออกแบบ probe เพื่อใช้สำหรับวิธี *in situ* hybridization คือ 1051 bp digoxygenin labeled probe ซึ่งได้มาจากการโคลน 1061 bp YHV cDNA และสร้าง template ที่ถูกโคลนนั้น โดยใช้ PCR ซึ่ง primer ที่ใช้ คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sense: 5′-ACA TCT GTC CAG AAG GCG TC-3′

Antisense: 5′-GGG GGT GTA GAG GGA GAG AG-3′

จากนั้นได้สร้าง primer ที่ออกแบบมาจาก เฟกเมนต์ของ cDNA สำหรับการตรวจหา amplicon ที่มีความจำเพาะกับไวรัสหัวเหลือง basepair ที่ 273 โดยวิธี RT-PCR:

Sense: 5′-CAA GAT CTC ACG GCA ACT CA-3′

Antisense: 5′-CGA CGA GAG TGT TAG GAG G-3′

นอกจากนั้น probe อื่นที่ใช้ใน *in situ* hybridization นั้นให้ผลที่ดีทั้ง GAV และไวรัสหัวเหลืองที่ไม่รุนแรงในประเทศไทยตามรายงานของ Soowannayan *et al*. (2003) ส่วน primer ที่ออกแบบจากแฟรกเมนต์ที่มีความจำเพาะกับไวรัสหัวเหลือง basepair ที่ 794 โดย RT-PCR ซึ่งเตรียมจาก YHV สายพันธุ์รุนแรงจากประเทศไทยเป็น template คือ

Sense: 5′-GAC ATC ACT CCA GA-3′

Antisense: 5′-GTG AAG TCC ATG TGT GTG AGA-3′

จากการศึกษาของ Cowley *et al*. (2000) พบว่าลำดับของ primer ที่ใช้ตรวจ YHV, Australian lymphoid organ virus (LOV) (Spann *et al*., 1995) and gill associated virus (GAV) (Spann *et al*., 1998) มีความสัมพันธ์กัน ซึ่ง primer ออกแบบจากการโคลน cDNA GAV basepair ที่ 781 ที่ให้ RT-PCR product ที่ 681 bp คือ

Sense: 5′-AAC TTT GCC ATC CTC GTC AC-3′

Antisense: 5′-TGG ATG TTG TGT GTT CTC AAC-3′

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไม

สำหรับกุ้งขาวแวนนาไมพบว่ากุ้งที่ได้รับเชื้อ YHV จะมีการตอบสนองและการเคลื่อนไหวช้าลง เมื่อตายบริเวณปลายหางและขาว่ายน้ำจะมีสีแดง อย่างไรก็ตามพบว่าการตายของกุ้งที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวเริ่มลดลงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 เนื่องจากมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งจากระบบเปิดมาเป็นระบบปิดถ่ายน้ำน้อยลงหรือใช้ระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียน แต่การแพร่ระบาดของไวรัสยังคงมีอยู่และก่อให้เกิดความเสียหายกับการเลี้ยงกุ้งในเอเชีย (Lightner *et al.*, 1996) จากการศึกษาโรคในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำของปิยนุช (2550) พบว่าลักษณะอาการภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ YHV จะพบว่า ลำตัวของกุ้งมีสีซีด ส่วนหัวมีสีเหลืองเนื่องจากบริเวณตับและตับอ่อนมีสีซีดเหลือง ต่างจากกุ้งปกติที่จะมีตับและตับอ่อนสีน้ำตาล ลำตัวมีสีซีดกว่าปกติ และเมื่อยืนยันผลด้วยชุดทดสอบ immunogold test strip YHV/GAV พบว่าให้ผลเป็นบวกในขณะที่กุ้งบางส่วนที่ส่วนหัวมีสีปกติให้ผลเป็นลบ

4. โรคตัวพิการ (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus : IHHNV)

ลักษณะทั่วไปของโรค

โรคตัวพิการที่พบได้ทั่วไปในระหว่างการเลี้ยงในบ่อ โดยเฉพาะลูกกุ้งขาวที่มาจากการนำกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในบ่อดินในพื้นที่ต่างๆ แล้วนำมาทำเป็นพ่อแม่พันธุ์ในเวลาต่อมา กุ้งขาวแวนนาไมที่เป็นโรคตัวพิการ จะมีลักษณะที่สังเกตได้ง่าย คือ กรีผิดปกติ อาจจะกุดหรือสั้นกว่าปกติ อาจจะบิดไปทางซ้ายหรือทางขวา นอกจากนั้นอาจจะพบว่ากุ้งมีลำตัวขรุขระหรือคดงอ ลักษณะที่กล่าวมานี้สังเกตได้หลังจากปล่อยลูกกุ้งเลี้ยงในบ่อประมาณ 30 วัน ปริมาณการเกิดลักษณะผิดปกติมีตั้งแต่ไม่รุนแรงมากคือมีประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ จนถึงรุนแรงมาก คือ ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ของกุ้งที่อยู่ในบ่อมีลักษณะผิดปกติ และกุ้งเหล่านี้จะโตช้ามาก มีอัตรารอดในบ่อต่ำ ทำให้ผลผลิตรวมต่ำด้วยแต่ไม่พบการตายของกุ้งตามขอบบ่อตลอดระยะเวลาในการเลี้ยง (จิราพร, 2547) นอกจากกุ้งที่มีอาการผิดปกติบางตัวจะอ่อนแอไม่แข็งแรง แนวโน้มมีการนำกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดินมาเป็นพ่อแม่พันธุ์เนื่องจากราคาถูก โอกาสจะพบโรคตัวพิการน่าจะเพิ่มตามขึ้นด้วยเช่นกัน การพบโรคตัวพิการพบได้ตลอดทั้งปีขึ้นกับแหล่งของกุ้งที่นำไปเลี้ยง ถ้าเป็นลูกกุ้งจากพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อโอกาสที่จะพบโรคตัวพิการมีน้อยมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาเหตุของโรคและความรุนแรง

โรคตัวพิการ เกิดจากไวรัส Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) เป็นไวรัสดีเอ็นเอ สายเดี่ยว (single strand DNA) มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (icosahedron) ไม่มีผนังหุ้ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22-23 นาโนเมตร ซึ่ง โรคไวรัส IHHNV ก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง หรืออาการ “runt-deformity syndrome” (RDS) ในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งจะทำให้กุ้งโตช้าและมีเปลือกผิดปกติมากกว่าจะทำให้กุ้งตาย กุ้งเต็มวัยที่ติดเชื้ออาจจะไม่แสดงอาการของโรคเลย แต่สามารถส่งผ่านเชื้อไวรัสไปยังกุ้งตัวอื่นๆในโรงเพาะฟักได้ (Bell and Lightner, 1984; Brock and Main, 1994) กุ้งระยะ juvenile ที่มีอาการ RDS จะมีขนาดแตกต่างกันมากซึ่งจะมีค่าความแปรปรวน (coefficient of variation) ของขนาดมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งปกติจะมีค่าแปรปรวนประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ (Lightner ,1996)

ไวรัสชนิดนี้พบครั้งแรกใน blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) และกุ้งขาวแวนนาไมในแถบอเมริกา ในช่วงปี ค.ศ.1980 (Lightner *et al*.,1983)

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

เมื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่เป็นโรคไวรัส IHHNV เมื่อย้อมด้วยสี H&E จะพบ inclusion แบบ Cowdry type-A และ inclusion body ย้อมติดสีอีโอซินภายในนิวเคลียส ซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้นของเซลล์ที่มีกำเนิดจากชั้น ectoderm ได้แก่ เหงือก เยื่อบุผิวและปมประสาท และอวัยวะที่กำเนิดมาจากmesoderm (อวัยวะสร้างเม็ดเลือด ต่อมโคนหนวด และต่อมน้ำเหลือง) (จิรพร, 2547) เช่นเดียวกับรายงานของ Lightner (1996) จำนวนของ inclusion ที่พบจะขึ้นกับความรุนแรงของอาการของโรค ถ้ากุ้งที่มีขนาดเล็กมาก กรีกุด กรีงอหรือมีลำตัวที่บิดเบี้ยวร่วมด้วยก็จะพบว่ามีจำนวนของ inclusion ที่มากขึ้นเช่นกัน เมื่อศึกษาการติดเชื้อไวรัส IHHNV ในเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งขาวด้วยวิธี *in situ* hybridization พบ inclusion ในเนื้อเยื่อที่กำเนิดมาจากชั้น ectoderm และ mesoderm

การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัย IHHNV สามารถทำการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ส่วนการทดสอบด้วย gene probe นั้นจะใช้ probe BS 4.5, BA 4.2 (ชุดทดสอบสำเร็จรูป จาก DiagXotic, Inc.) หรือ probe

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวอื่น ๆ ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ IHHNV โดยสามารถใช้ได้ทั้งเทคนิค dot blot hybridization และวิธี animal bioassay โดยใช้ *Penaeus stylirostris* เป็น indicator ซึ่งสามารถตรวจยืนยันเชื้อได้โดยการทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน

การใช้เทคนิค *in situ* hybridization และ probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ IHHNV สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ IHHNV ระยะแรก ๆ ในกุ้ง และสามารถใช้แยกเชื้อ IHHNV จากเชื้อ WSSV ได้ (Lightner, 1993; Lightner, 1996b; Lightner & Redman, 1998a; Lightner, *et al*. 1992) นอกจากนี้อาจจะใช้เทคนิค PCR ซึ่งระบุไว้ใน OIE Aquatic Animal Health Manual (Anonymous, 2000) ซึ่งเป็นการตรวจหาชิ้นส่วน DNA ขนาด 356 bp ของเชื้อ IHHNV โดยใช้ primers

Sense: 5'- ATC GGT GCA CTA CTC GGA- 3'
Antisense: 5'-TCG TAC TGG CTG TTC ATC– 3'

นอกจากนี้อาจจะใช้เทคนิคอื่น ๆ เช่น digital color correlation (Alvarez-Borrego & Chavez-Sanchez, 2001) หรือ real-time PCR แบบ single assay (Tang and Lightner, 2001) หรือ duplex assay (Dhar *et al*., 2001)

5. โรคไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV)

ลักษณะทั่วไปของโรค

โรคกุ้งหลังขาวทำความเสียหายให้แก่การอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามมาก จากการศึกษาของศุภมาศ (2549) ได้ทำการศึกษาในโรงเพาะฟักในอำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี สังเกตเห็นลูกกุ้งเกิดอาการหลังขาวมักจะทยอยตายจนหมดบ่อ อาการของลูกกุ้งที่เป็นหลังขาว คือ ลำตัวมีสีขาวขุ่น สีเหมือนเมล็ดข้าวเหนียว ในขณะที่ลูกกุ้งที่ไม่ป่วย กล้ามเนื้อจะใสเหมือนเมล็ดข้าวเจ้า

การติดเชื้อโรคหลังขาว ทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามระยะโพสลาร์วา หรือลูกกุ้งระยะคว่ำ มีอัตราการตายสูง ในระยะแรกจะสังเกตเห็นลักษณะลำตัวส่วนท้องมีสีขาวขุ่น และแผ่ขยายเพิ่มขึ้นจนกระทั่งขาวขุ่นทั้งตัว ลูกกุ้งบางส่วนจะเริ่มตาย และอัตราการตายจะเพิ่มมากขึ้น อาจจะถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเริ่มพบว่าลูกกุ้งมีลำตัวขาวขุ่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจัยหลักในการระบาดของไวรัสทั้งสองชนิดนี้มาจากการติดเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ โดยการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแม่พันธุ์กุ้งที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ในปริมาณมาก คือ สามารถตรวจพบไวรัสได้ทั้งในเนื้อเยื่อและในเลือด ลูกกุ้งที่ได้จะอ่อนแอ และเริ่มพบการตายตั้งแต่ 13 วันหลังจากฟัก จากนั้นอัตราการตายจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งตายหมดภายใน 20-25 วัน ในขณะที่แม่พันธุ์กุ้งที่มีการปนเปื้อนของไวรัสน้อยกว่า คือตรวจพบไวรัสในเนื้อเยื่อแต่ไม่พบไวรัสในเลือด จะมีอัตราการตายต่ำกว่า คือประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามลูกกุ้งที่เหลือรอดเหล่านี้ยังมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัวเมื่อนำไปเลี้ยงในบ่อดิน ถ้าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมกุ้งเครียดก็และมีกุ้งบางส่วนทยอยตาย โดยกุ้งตัวที่อ่อนแอและป่วยลำตัวมีสีส้ม เมื่อดูดเลือดกุ้งที่มีตัวสีส้มเหล่านี้ออกมาดูจะพบว่าเป็นสีส้ม แตกต่างจากกุ้งปกติ ซึ่งเลือดจะมีสีค่อนข้างใส ซึ่งอาการดังกล่าวจะพบบ่อยในช่วงอากาศร้อนจัด ระหว่างเดือนมีนาคม และเมษายน ในพื้นที่ภาคกลางจะพบปัญหากุ้งก้ามกรามในบ่อทยอยตายเป็นจำนวนมาก เมื่อนำมาตรวจโดยวิธี RT-PCR พบการปนเปื้อนของไวรัสทั้งสองชนิด

สาเหตุของโรค

Nash *et al.* (1987) รายงานว่าในการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยด้วยความหนาแน่นสูง เมื่อลูกกุ้งเข้าสู่ระยะโพสลาร์วา หรือมีอายุประมาณ 28 วัน ลูกกุ้งจะมีอาการกล้ามเนื้อเป็นสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมจะมีอัตราการตายสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเกิดจากการตายของกล้ามเนื้อโดยไม่ทราบสาเหตุจึงเรียกอาการนี้ว่า idiopathic muscle necrosis หรือ IMN ในขณะที่การศึกษาของ Arcier *et al*. (1999) และ Tung *et al*. (1999) รายงานการติดเชื้อไวรัสในลูกกุ้งก้ามกรามที่มีอาการกล้ามเนื้อสีขาวขุ่นและมีอัตราการตายสูงในโรงเพาะฟักในหมู่เกาะ Guadeloupe ใน French West Indies และในประเทศไต้หวัน ต่อมา Qian *et al*. (2003) ได้สกัดเชื้อไวรัสจากกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อโรค white muscle disease หรือ WMD พบอนุภาคไวรัส 2 ชนิดซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน โดยอนุภาคชนิดแรกมีขนาดใหญ่กว่าคือ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) ซึ่งจะพบอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีโครงสร้างแบบ non-enveloped, icosahedral ขนาด 26-27 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์โดยวิธี negative staining (Arcier *et al*., 1999; Qian *et al*., 2003; Romestand and Bonami, 2003) พบ genome ประกอบด้วย RNA สายเดียวมีขนาด 2.90 kb และอนุภาคไวรัสอีกชนิดหนึ่งมีขนาดเล็กเพียง 1.30 kb เรียกว่า extra small virus (XSV) (Arcier *et al*., 1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

เมื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกรามที่มีกล้ามเนื้อขาวขุ่นจะพบการตายของกล้ามเนื้อลาย (striated muscle necrosis) ที่ส่วนท้อง หัว หาง และรยางค์ของลูกกุ้ง บางครั้งจะพบลักษณะการหดตัวอัดรวมกันแน่นของนิวเคลียส (pyknotic nuclei) ภายในกลุ่มเซลล์กล้ามเนื้อที่ตาย เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน พบอนุภาคของไวรัสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22-25 นาโนเมตรเป็นจำนวนมากบริเวณที่เกิด inclusion bodies ในเซลล์กล้ามเนื้อลายที่เกิดการตาย

ในขณะที่ศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อแม่พันธุ์กุ้งพบลักษณะ basophilic cytoplasmic inclusions ในส่วนของกล้ามเนื้อ เมื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน พบอนุภาคของไวรัสขนาดเดียวกับที่พบในลูกกุ้งคือ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22-25 นาโนเมตร เมื่อนำตัวอย่างลูกกุ้งและแม่พันธุ์กุ้งป่วยดังกล่าวไปศึกษาโดยใช้วิธี RT-PCR ตรวจพบไวรัส 2 ชนิด คือ *Mr*NV และ XSV โดยไวรัสทั้งสองชนิดนี้เป็นไวรัสชนิด อาร์ เอ็น เอ สายเดี่ยว มีขนาด 2.9 และ 1.3 กิโลเบส ตามลำดับ ไวรัสดังกล่าวนี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหาย แก่ลูกกุ้งในโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามในหลายประเทศ ได้แก่ อินเดีย จีน ไต้หวัน ฯลฯ (Arcier *et al*. 1999,Tung *et al*.,1999, Yoganandhan *et al*., 2005)

การวินิจฉัยโรค

การตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจาก *Mr*NV สามารถทำได้โดยการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งและการศึกษาด้วย RT-PCR ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจพบเชื้อได้

<u>การตรวจวิเคราะห์ชนิดของไวรัสโดยเทคนิค RT-PCR</u>

1. Total RNA extract (สารสกัด RNA ทั้งหมด)
2. การตรวจวิเคราะห์ไวรัสชนิด *Mr*NV และ XSV โดยวิธี RT-PCR

การตรวจวิเคราะห์แบบ Reverse-ITTM one-step RT-PCR ซึ่งสามารถเกิด reverse transcription (RT) และการเพิ่มจำนวน (amplification) ได้ใน single reaction tube ใช้ primer pair ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Mr*NV ซึ่งออกแบบมาจาก sequence data ของ *Mr*NV genome (Sri

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Widada *et al*., 2003; Suhal Hameed *et al*., 2004a) DNA amplification มีขนาด 681 bp sequence ที่ใช้คือ

Sense: 5′-GAT ACA GAT CCA CTA GAT GAC C-3′ (forward) และ

Antisense: 5′-GAC GAT AGC TCT GAT AAT CC-3′ (reverse)

6. การศึกษาการติดเชื้อไวรัสในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่เยือกแข็ง

Nunan *et al*. (1998) ทำการศึกษา White spot syndrome virus (WSSV) และ Yellow head virus (YHV) ในการนำเข้าสินค้ากุ้ง ซึ่งโรคทั้งสองชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายจำนวนมากในการเลี้ยงกุ้งในเอเชียตั้งแต่ปี ค.ศ. 1992 ซึ่งในปี ค.ศ. 1995 พบไวรัสครั้งแรกในซีกโลกตะวันตกซึ่งเป็นสาเหตที่มีการตายสูงในฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่ มลรัฐ เท็กซัส ประเทศ สหรัฐอเมริกา การใช้ TEM และ PCR แสดงผลการติดเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในกุ้งแช่เยือกแข็งที่นำเข้า กุ้งแช่เยือกแข็งถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อกุ้ง blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) ซึ่งมีผลทำให้เกิดการตาย ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งสามารถถ่ายทอดผ่านผลิตภัณฑ์กุ้งแช่เยือกแข็งได้ นอกจากนี้

Reville *et al*. (2005) ทำการศึกษา WSSV ในอาหารกุ้งแช่เยือกแข็งที่ Massachusetts ซูเปอร์มาร์เก็ต โดยการใช้เทคนิค PCR ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษาให้ผลบวกกับ WSSV ซึ่งจะต้องมีการจัดการความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นกับการแพร่ระบาดของโรคในสหรัฐอเมริกา Ueda *et al*. (2008) ศึกษา TSV และ IHHNV โดยใช้วิธีPCR ผลการศึกษาพบไวรัส 2 ชนิดนี้ในสินค้ากุ้งแช่เยือกแข็งที่เข้ามาในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งพบกุ้งติดเชื้อ TSV จำนวน 6 ตัว ในกุ้งทั้งหมด 10 ตัว ที่ร้านขายปลีกที่ Townsville และพบการติดเชื้อจำนวน 10 ตัว ในกุ้งทั้งหมด 10 ตัว จาก Coff's Harbour โดยการใช้วิธี RT-PCR นอกจากนี้พบกุ้งที่ติดเชื้อ IHHNV จำนวน 5 ตัว จากทั้งหมด 5 ตัว และพบกุ้งติดเชื้อ 5 ตัว จากทั้งหมด 6 ตัว ที่รวบรวมจาก Townsville และ Coff's Habour

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ผลิตภัณฑ์กุ้งจากโรงงานแปรรูป

ผลิตภัณฑ์ที่โรงงานแปรรูปในประเทศไทยผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศประกอบด้วย

Cooked Shrimp

- Tail-off Shrimp
- Tail-on Shrimp
- Shrimp Ring
- Cooked Headless
- Cooked Head-on

Raw Shrimp

- Raw Peeled Shrimp
- Raw Head-on
- Raw Headless
- Raw Shrimp Skewers

Value added

- Hand Breaded Shrimp
- Shrimp Wraps
- Marinated Shrimp

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาการปนเปื้อนของโรค ไวรัส 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งของประเทศไทย และการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากผลิตภัณฑ์กุ้งส่งออกไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเก็บตัวอย่าง

ศึกษาหาความเป็นไปได้ของการปรากฏของโรค (Probability of establishment) ทั้ง 5 โรค ได้แก่ โรคหัวเหลือง (Yellow head disease) โรคดวงขาว (White spot disease) โรคไวรัสตัวพิการ (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis disease) โรคไวรัสทอร่า (Taura disease) และโรคไวรัสกล้ามเนื้อขาวขุ่นที่ระบาดในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม (White tail disease) จากผลิตภัณฑ์กุ้งสดแช่เยือกแข็งส่งออกของไทยที่เป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของประเทศไทยโดยประสานงานกับสมาคมผู้ส่งออกสินค้าแช่เยือกแข็งไทย ในการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุ้งสดแช่เยือกแข็งที่เป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกออก ของสมาชิกสมาคมฯ จำนวน 100 ตัวอย่างทั่วประเทศไทย โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเดือนละ 20 ตัวอย่างจากโรงงานแปรรูปที่เป็นสมาชิกของสมาคมฯ ตั้งแต่เดือน มิถุนายนถึงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2552 เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนโรคดังกล่าว โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์กุ้งสดแช่เยือกแข็งที่เป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกมาศึกษาการปนเปื้อน ณ ห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

1.2 การตรวจวินิจฉัยโรค

1.2.1 วินิจฉัยโรคโดยวิธี PCR และ RT-PCR

ตามวิธี ของ OIE (OIE, 2009) คือ วิธี PCR สำหรับ DNA ไวรัสและ RT-PCR สำหรับ RNA ไวรัส มี รายละเอียด primer ที่ใช้วิเคราะห์มีดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

IHHNV

ตรวจสอบการติดเชื้อ IHHNV ด้วยวิธี PCR

Primer	**Product**	**Sequence**	**reference**
77012F	356	5’-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3’	OIE Manual 2009/p.88
77353R		5’-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3’	

WSSV

ตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV ด้วยวิธี nested-PCR

First step

Primer	**Product**	**Sequence**	**reference**
146F1		5’-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCT-AG-3’	OIE Manual 2009/p.127
146R1		5’-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3’	

Second step

Primer	**Product**	**Sequence**	**reference**
146F1	941	5’-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3’	OIE Manual 2009/p.127
146R1		5’-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3’	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

*Mr*NV

ตรวจสอบการติดเชื้อ *Mr*NV ด้วยวิธี RT-PCR

Primer	**Product**	**Sequence**	**reference**
MrNV F	425	5'-GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'	Sahul hameed et al. (2009)
MrNV R		5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG-3'	

TSV Used Test kit IQ 2000

YHV/GAV Used Test kit IQ 2000

1.3 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการหาความน่าจะเป็น (Porbability)

1.4 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัว ผ่าไส้ และปอกเปลือกไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ

นำกุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด ตามที่กล่าวมาแล้วขนาด 10-12 กรัม จำนวน 250 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในจังหวัดจันทบุรีมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการโดยเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 500 ลิตร จำนวนถังละ 50 ตัว ให้อาหารสำเร็จรูปและมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา เป็นเวลา 7วันจากนั้นเลือกกุ้งขาวแวนนาไมที่มีสุขภาพแข็งแรงจำนวน 150 ตัว แบ่งกุ้งขาวแวนนาไมใส่ในตู้กระจกขนาดความจุ 150 ลิตร จำนวน 15 ตู้ ใส่กุ้งตู้ละ 10 ตัว ก่อนที่จะแบ่งตู้ทดลองออกเป็น 5 กลุ่มแต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำโดยแต่ละกลุ่มจะให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสที่ได้จากการประเมินความเสี่ยงทั้ง 5 โรค วันละ 2 มื้อติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน โดยกลุ่มที่ 1 ให้กุ้งขาวแวนนาไมกินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสดวงขาว (WSSV) กลุ่มที่ 2 ให้กุ้งขาวกินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง(YHV) กลุ่มที่ 3 ให้กุ้งขาวกินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตัวพิการ(IHHNV) กลุ่มที่ 4 ให้กุ้งขาวกินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสทอร่า (TSV) และ กลุ่มที่ 5 ให้กุ้งขาวกินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV) หลังจากนั้น 4 วันรวมเป็นเวลา 7 วัน จึงทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งเพื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจสอบการติดเชื้อโรคแต่ละชนิดตามวิธีของ OIE (2008) โดยใช้ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) สำหรับ กลุ่ม DNA ไวรัส ได้แก่ ไวรัสดวงขาว (WSSV) ไวรัสตัวพิการ (IHHNV) และใช้ ปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (RT-PCR) สำหรับ กลุ่ม RNA ไวรัส ได้แก่ ไวรัสหัวเหลือง (YHV) ไวรัสทอร่า (TSV) และไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV) โดยรายละเอียด primer ที่ใช้ในการตรวจสอบนั้นระบุไว้ตาม 1.2.1

2. การศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการในการผลิตกุ้งแช่แข็งซึ่งเป็นกุ้งถอดหัว ผ่าไส้ และปอกเปลือก ในการลดความสามารถในการติดเชื้อไวรัสโรคกุ้ง 5 ชนิดในห้องปฏิบัติการ

2.1 ฉีดเชื้อไวรัสเข้ากุ้งปกติ

นำกุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อขนาด 10-12 กรัม จำนวน 100 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในจังหวัดจันทบุรีมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร จำนวนถังละ 50 ตัว ให้อาหารสำเร็จรูปและมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา เป็นเวลา 7 วันจากนั้นคัดเลือกกุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกันจำนวน 50 ตัวแบ่งใส่ในตู้กระจกขนาด 150 ลิตร จำนวน 5 กลุ่ม กลุ่มละ 1 ตู้ ใส่กุ้งตู้ละ 10 ตัว โดยกลุ่มที่ 1จะฉีดเชื้อ ไวรัสดวงขาว (WSSV) กลุ่มที่ 2 ฉีดเชื้อไวรัสตัวพิการ (IHHNV) กลุ่มที่ 3 ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง(YHV) กลุ่มที่ 4 ฉีดเชื้อไวรัสทอร่า (TSV) และกลุ่มที่ 5 ฉีดเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV) โดยไวรัสทั้ง 5 ชนิดจะสกัดมาจากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวจากฟาร์มเลี้ยงโดยใช้วิธีสกัดตาม OIE (2008) ก่อนที่จะฉีดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดเข้าไปยังกล้ามเนื้อปล้องที่ 5 ของกุ้งทดลองในแต่ละกลุ่มปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งไว้จนกว่ากุ้งทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อเริ่มแสดงอาการป่วย จึงเก็บตัวอย่างกุ้งทดลองทั้งหมดที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตามวิธีของ OIE (2008)

จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างดังกล่าวใส่ในตู้แช่แข็งที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นอาหารแก่กุ้งปกติในการทดลองต่อไป

2.2 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจากการฉีดเชื้อ

จากนั้นจึงนำกุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อขนาด 10-12 กรัม จำนวน 200 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในจังหวัดจันทบุรีมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความจุ 500 ลิตร ถังละ 50 ตัวเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นคัดเลือกกุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงและมีขนาดไล่เลี่ยกันจำนวน 150 ตัวมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 150 ลิตร จำนวน 15 ตู้ ใส่กุ้งตู้ละ 10 ตัว ให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมเป็นอาหารทุกวันวันละ 4 มื้อ ที่เวลา 08.00 น. 12.00 น. 16.00 น.และ 20.00 น. ก่อนที่จะแบ่งตู้ทดลองออกเป็น 5 กลุ่มแต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจากการฉีดเชื้อซึ่งได้จากการทดลองที่ 2.1 เป็นอาหารทุกวัน วันละ 2 มื้อ ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน โดยกลุ่มที่ 1 ให้กุ้งปกติกินกุ้งตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัส IHHNV กลุ่มที่ 2 ให้กุ้งปกติกินกุ้งตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัส TSV กลุ่มที่ 3 ให้กุ้งปกติกินกุ้งตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัส YHV กลุ่มที่ 4 ให้กุ้งปกติกินกุ้งตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัส WSSV และกลุ่มที่ 5 ให้กุ้งปกติกินกุ้งตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัส *Mr*NV หลังจากนั้นอีก 3 วันจึงทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งเพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด ตามวิธีของ OIE (2008)

2.3 นำกุ้งตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการแปรรูปของห้องเย็น

จากนั้นผู้วิจัยจึงเก็บตัวอย่างกุ้งทั้งหมดในวันที่ 4 ก่อนที่จะนำกุ้งตัวอย่างแต่ละกลุ่มใส่ในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวไปแปรรูปตามขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกใน ห้องทดลองของ โรงงานแปรรูปที่เป็นสมาชิกของสมาคมอาหารแช่เหยือกแข็งไทย ที่จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเดินทางประมาณ 2 ชั่วโมง โดยขั้นตอนการแปรรูปดังกล่าวแสดงไว้ในภาพที่ 6 ในระหว่างกระบวนการแปรรูปผู้วิจัยได้ทำการสุ่มเก็บกุ้งตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส ทั้ง 5ชนิด ไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ จำนวน 2 ครั้งแต่ละครั้งเก็บตัวอย่างกุ้งครั้งละ 10 ตัว คือครั้งแรกหลังจากทำการถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกแล้วล้างด้วยน้ำที่มีสารคลอรีน 50 ppm และสำหรับการเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้ายคือหลังจากเสร็จกระบวนการแปรรูปทั้งหมดแล้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. นำกุ้งใส่ตะกร้าล้างด้วยคลอรีน 50 ppm จำนวน 2 ครั้ง

2. นำมาผ่าหัวใส่กะละมัง

ภาพที่ 1 แสดงกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกตามมาตรฐานของสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ล้างด้วยคลอรีน 50ppm เป็นเวลา 1 นาที

4. แกะเปลือกกุ้ง และผ่าหลังเอาไส้ออก

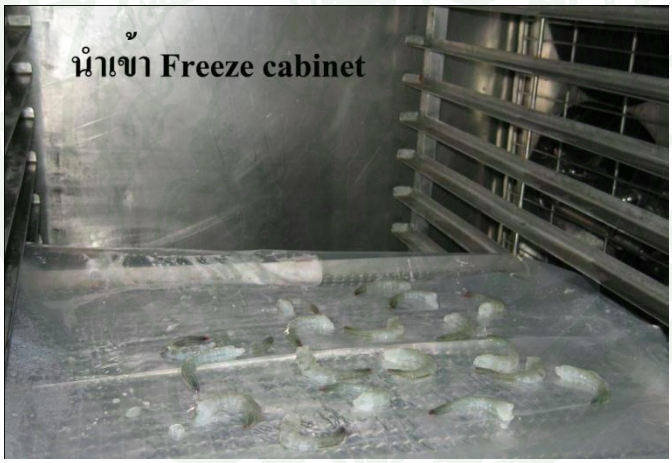
ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างกุ้งครั้งที่ 1 หลังผ่านคลอรีน (50 ppm)

ภาพที่ 1 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. ใส่ตะกร้านำไปล้างด้วยคลอรีน 10 ppm เป็นเวลา10 วินาที จำนวน 2 ครั้ง

6. นำกุ้งไปเข้า Freeze cabinet ที่อุณหภูมิ – 60 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 1 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ใส่ตะกร้าล้างด้วยน้ำสะอาด (เพื่อให้กุ้งที่ออกจาก Freeze cabinet ไม่ติดกัน)

8. นำไปบรรจุถุง

ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างกุ้งอีกครั้งหลังเสร็จขบวนการแปรรูป

ภาพที่ 1 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากกุ้งที่ผ่านขบวนการแปรรูป

การศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากตัวอย่างกุ้งที่ผ่านขบวนการแปรรูปตามขั้นตอนการแปรรูปผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกตามมาตรฐานของสมาคมอาหารแช่เหยือกแข็งไทยไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ การศึกษาครั้งนี้ใช้กุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อขนาด 6-8 กรัม จำนวน 400 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ในจังหวัดจันทบุรีมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วันโดยเลี้ยงในถังไฟเบอร์ขนาด 500 ลิตร จำนวน 8 ถังใส่กุ้งถังละ 50 ตัว เลี้ยงกุ้งเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วันให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมเป็นอาหารทุกวันวันละ 4 มื้อ ที่เวลา 08.00 น. 12.00 น. 16.00 น.และ 20.00 น. จากนั้นคัดเลือกกุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงจำนวน 300 ตัวมาทดลองโดยแบ่งกุ้งใส่ตู้กระจกขนาด 150 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 30 ตู้ แบ่งการทดลองออกเป็น 10 กลุ่มแต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นอาหารทุกวันวันละ 2 มื้อ ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน ดังมีรายละเอียดดังนี้

กลุ่ม1 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ *Mr*NV ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหลังล้างด้วยคลอรีน 50 ppm
กลุ่ม 2 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ *Mr*NV ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปครั้งสุดท้าย
กลุ่ม3 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ IHHNVที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหลังล้างด้วยคลอรีน 50 ppm
กลุ่ม 4 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ IHHNVที่ผ่านกระบวนการแปรรูปครั้งสุดท้าย
กลุ่ม5 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ TSV ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหลังล้างด้วยคลอรีน 50 ppm
กลุ่ม 6 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ TSV ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปครั้งสุดท้าย
กลุ่ม7 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ YHV ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหลังล้างด้วยคลอรีน 50 ppm
กลุ่ม 8 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ YHV ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปครั้งสุดท้าย
กลุ่ม9 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหลังล้างด้วยคลอรีน 50 ppm
กลุ่ม 10 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อ YHV ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปครั้งสุดท้าย

จากนั้นเก็บตัวอย่างนำไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด ตามวิธีของ OIE (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาการปนเปื้อนของโรคในผลิตภัณฑ์กุ้งของประเทศไทย และการถ่ายทอดเชื้อโรคจากผลิตภัณฑ์กุ้งส่งออกไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ

1.1 ผลการตรวจโรคกุ้งในผลิตภัณฑ์กุ้งสดแช่เยือกแข็งที่ผ่านการถอดหัวปอกเปลือกของสมาคมผู้ส่งออกสินค้าแช่เยือกแข็งไทย

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาความน่าจะเป็น (Probability) พบว่าเดือนมิถุนายน ความน่าจะเป็นในการเกิดโรครวม 4 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยโรคตัวแดงดวงขาวมีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 1 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่างที่ตรวจพบโรค โรคตัวพิการมีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 2 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่าง และพบความน่าจะเป็นในการพบโรคตัวแดงดวงขาว และโรคตัวพิการร่วมกัน มีความน่าจะเป็นเท่ากับ 1 ตัวอย่างใน 4 ตัวอย่าง

เดือนกรกฎาคม พบว่าความน่าจะเป็นในการเกิดโรครวม 8 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยพบการเกิดโรคทั้งหมด 4 โรค โรคทอร่ามีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 2 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่างที่พบโรค โรคหัวเหลืองมีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 2 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่างที่ตรวจพบโรค โรคตัวพิการ มีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 2 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่าง และโรคหลังขาวมีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 2 ตัวอย่างจาก 8 ตัวอย่างที่ตรวจพบโรค

เดือนสิงหาคม ความน่าจะเป็นในการเกิดโรครวม 9 ตัวอย่างจากการตรวจทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยพบว่าโรคทอร่ามีความน่าจะเป็น 4 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างที่ตรวจพบการเกิดโรค

โรคตัวพิการ มีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 2 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างที่ตรวจพบการเกิดโรค โรคหัวเหลืองมีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 1 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างที่ตรวจพบการเกิดโรค โรคหางขาวมีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 1 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่างที่ตรวจพบโรค และท้ายสุดพบการติดเชื้อร่วมกันระหว่างโรคหัวเหลืองและโรคหลังขาว มีความหน้าจะเป็นเท่ากับ 1 ตัวอย่าง ใน 9 ตัวอย่างที่ตรวจพบโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เดือนกันยายนมีความน่าจะเป็นในการเกิดโรครวม 4 ตัวอย่างจากการตรวจทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยโรคที่พบประกอบด้วยโรคตัวแดงดวงขาวมีความน่าจะเป็นที่เกิดโรค 3 ตัวอย่างใน 4 ตัวอย่างที่ตรวจพบการเกิดโรค และอีกโรคที่พบคือโรคทอร่ามีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 1 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่างที่ตรวจพบโรค

ในเดือนตุลาคมมีความน่าจะเป็นในการเกิดโรครวม 5 ตัวอย่างจากการตรวจทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยพบว่าความน่าจะเป็นที่จะเกิดโรคตัวแดงดวงขาวคือ 3 ตัวอย่าง ใน 5 ตัวอย่าง และพบโรคทอร่า มีความน่าจะเป็นในการเกิดโรค 2 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่างที่ตรวจพบโรค

จะสังเกตได้ว่าโรคตัวแดงดวงขาวนั้นตรวจพบในเดือนมิถุนายน จากนั้นไม่พบการเกิดโรคนี้ใน 2 เดือนถัดไปคือเดือนกรกฎาคม และสิงหาคม แต่กลับมาพบอีกในเดือนกันยายน และตุลาคม ซึ่งความน่าจะเป็นของโรคนี้เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากช่วงเดือนดังกล่าวมีอุณหภูมิอากาศลดต่ำลง จึงพบการเกิดโรคตัวแดงดวงขาวได้มากกว่าช่วงอุณหภูมิสูง สอดคล้องกับรายงานของ ชลอ (2547) ที่บอกว่าโรคตัวแดงดวงขาวพบได้ตลอดทั้งปีแต่ส่วนใหญ่เกิดในช่วงการเลี้ยงที่อุณหภูมิอากาศต่ำลง นอกจากนี้ สุธี (2553) รายงานว่าการระบาดของโรคไวรัสดวงขาวจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ ถ้าอุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส เชื้อไวรัสดวงขาวจะไม่สามารถจำลองตัวได้ ทำให้การแพร่ระบาดของโรคไวรัสชนิดนี้ลดลงในช่วงฤดูร้อน ในขณะที่การระบาดของไวรัสชนิดอื่นๆ ทั้ง YHV, TSV, IHHNV และ *Mr*NV นั้น ไม่มีรายงานว่าจะมีความรุนแรงขึ้นกับฤดูกาลหรืออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปแต่อย่างใด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้ปลอดเปลือกของไทยในเดือนมิถุนายน 2552

ห้องเย็น	ตัวอย่าง	ผลการตรวจ				
		WSSV	**IHHNV**	**TSV**	**YHV**	***Mr*NV**
A	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	+	-	-	-
	4	-	+	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
C	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
D	1	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
Total	**20**	**2**	**3**	**0**	**0**	**0**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่1 (ต่อ)

หมายเหตุ **WSSV** = White spot syndrome virus:
IHHNV = Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus
TSV = Taura syndrome virus
YHV = Yellow head virus
MrNV = *Macrobranchium rosenbergii* nodavirus

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยใน เดือนกรกฎาคม 2552

ห้องเย็น	ตัวอย่าง	ผลการตรวจ				
		WSSV	**IHHNV**	**TSV**	**YHV**	***Mr*NV**
A	1	-	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-
	2	-	+	-	-	-
	3	-	+	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
C	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	+	-
	5	-	-	-	+	-
D	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	+
	5	-	-	-	-	+
Total	**20**	**0**	**2**	**2**	**2**	**2**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยใน เดือนสิงหาคม 2552

ห้องเย็น	ตัวอย่าง	ผลการตรวจ				
		WSSV	**IHHNV**	**TSV**	**YHV**	***Mr*NV**
A	1	-	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	+	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-
	2	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	+
C	1	-	-	-	+	+
	2	-	-	-	+	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
D	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	-	-
	3	-	-	+	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
Total	**20**	**0**	**2**	**4**	**2**	**2**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยในเดือนกันยายน 2552

ห้องเย็น	ตัวอย่าง	ผลการตรวจ				
		WSSV	**IHHNV**	**TSV**	**YHV**	***Mr*NV**
A	1	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	+	-	-
B	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
C	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
D	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
Total	**20**	**3**	**0**	**1**	**0**	**0**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกของไทยในเดือนตุลาคม 2552

ห้องเย็น	ตัวอย่าง	ผลการตรวจ				
		WSSV	**IHHNV**	**TSV**	**YHV**	***Mr*NV**
A	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
B	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-
C	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
D	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	+	-	-
	5	-	-	+	-	-
Total	**20**	**3**	**0**	**2**	**0**	**0**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการสำรวจการติดเชื้อโรคไวรัสที่สำคัญทั้ง 5 โรคในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกจากโรงงานที่เป็นสมาชิกของสมาคมอาหารแช่เหยือกแข็งไทยจำนวน 4 โรงงาน โรงงานละ 25 ตัวอย่างในช่วงเดือน มิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 พบว่า เชื้อไวรัสที่ตรวจพบมากที่สุดคือเชื้อไวรัสทอร่า(TSV) ซึ่งตรวจพบทั้งหมดถึง 9 ตัวอย่างตามด้วย เชื้อไวรัสดวงขาว (WSSV) 8 ตัวอย่าง ไวรัส (IHHNV) 7 ตัวอย่าง ไวรัสหัวเหลืองและไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในลูกกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV) พบจำนวนเท่ากันคือ ชนิดละ 4 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัส ทั้ง 5 ชนิด ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกจากโรงงานแปรรูปที่เป็นสมาชิกของสมาคมอาหารแช่เหยือกแข็งไทยทั้ง 5 โรงงาน ตลอดระยะการศึกษา (5 เดือน)

ห้องเย็น	จำนวนตัวอย่าง	ผลการตรวจ				
		WSSV	**IHHNV**	**TSV**	**YHV**	***Mr*NV**
A	25	2	3	5	-	-
B	25	1	3	-	-	1
C	25	3	-	-	4	1
D	25	2	1	4	-	2
Total	100	8	7	9	4	4

1.2 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัว ผ่าไส้ และปอกเปลือกไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ

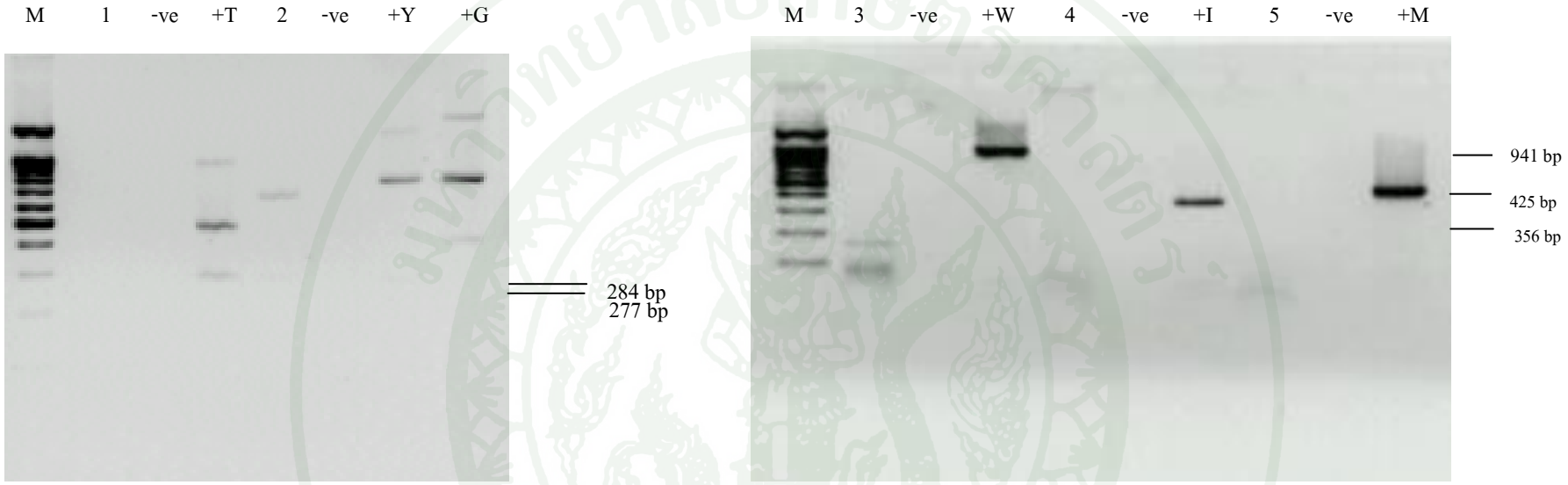
การศึกษาโดยนำผลิตภัณฑ์กุ้งที่ตรวจพบเชื้อไวรัสสำคัญทั้ง 5 ชนิดดังกล่าว ไปให้เป็นอาหารแก่กุ้งขาวแวนนาไมปกติที่ผ่านการตรวจด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR ว่าปลอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิดและผ่านการปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ พบว่า กุ้งทดลองทุกกลุ่มไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆและไม่มีการตายจากการตรวจด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR ไม่พบการติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด ตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 7 และภาพที่ 2 แสดงว่าผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกที่ส่งออกของไทยที่ถึงแม้ว่าจะตรวจพบการติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิดด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR แต่ไวรัสดังกล่าวได้สูญเสียความสามารถในการก่อโรคไปแล้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสสำคัญทั้ง 5 ชนิดในตัวอย่างกุ้งที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัว ผ่าไส้และปอกเปลือกจากสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย

โรค	ผลตรวจ PCR
WSSV	-
YHV	-
TSV	-
IHHNV	-
MrNV	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



+W (WSSV)= 941 bp +Y (YHV) = 277 bp

+I (IHHNV)= 356 bp

+G (GAV)= 406 bp

+T (TSV)= 284 bp

แสดงแถบ ดีเอ็นเอของกลุ่มควบคุมที่ติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิด (เนื่องจากชุดตรวจไวรัส YHV จะสามารถตรวจการติดเชื้อไวรัส GAV ได้ด้วยผู้วิจัยจึงได้นำเสนอผลการตรวจไวรัส GAV มาพร้อมนี้ด้วย)

ตัวอย่างที่ 1 กุ้งที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ติดเชื้อ TSV ผล -VE

ตัวอย่างที่ 2 กุ้งที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ติดเชื้อ YHV ผล -VE

ตัวอย่างที่ 3 กุ้งที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ผล -VE

ตัวอย่างที่ 4 กุ้งที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ติดเชื้อ IHHNV ผล -VE

ตัวอย่างที่ 5 กุ้งที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งที่ติดเชื้อ MrNV ผล -VE

หมายเหตุ : ตัวอย่างกุ้งที่ตรวจเป็นตัวอย่างรยางค์กุ้งโรคละสามตัวอย่างนำมารวมกัน แล้วแช่ใน 70% alcohol

ภาพที่ 2 แสดงผลการตรวจโรคไวรัสทั้ง 5 ชนิดในกุ้งปกติที่ให้กินผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัว ผ่าไส้และปอกเปลือกที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากโรงงานแปรรูป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการในการผลิตกุ้งแช่แข็งซึ่งเป็นกุ้งถอดหัว ผ่าไส้ และปอกเปลือก ในการลดความสามารถในการติดเชื้อไวรัสโรคกุ้ง 5 ชนิดในห้องปฏิบัติการ

2.1 ฉีดเชื้อไวรัสเข้ากุ้งปกติ

หลังจากสกัดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากกุ้งที่ป่วย ตามวิธีของ OIE (2008) แล้วจึงฉีดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดเข้าไปยังกล้ามเนื้อปล้องที่ 5 ของกุ้งทดลอง (ปลอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด) ในแต่ละกลุ่มปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งไว้จนกว่ากุ้งทดลองที่ได้รับการฉีดเชื้อเริ่มแสดงอาการป่วยโดยเฉพาะในวันที่ 3 หลังจากการฉีดเชื้อไวรัส โดยกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสดวงขาว(WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) จะเริ่มแสดงอาการป่วยไม่กินอาหาร ส่วนกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสทอร่า (TSV) ไวรัสตัวพิการ (IHHNV)และเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV) นั้นพบว่ากุ้งทดลองที่ได้รับเชื้อไวรัสไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา จึงเก็บตัวอย่างกุ้งทดลองทั้งหมดที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิดดังกล่าวไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตามวิธีของ OIE (2008) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่ากุ้งทุกตัวที่ทำการฉีดเชื้อมีการติดเชื้อไวรัส(ให้ผลบวกกับการทดสอบ)จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างดังกล่าวใส่ในตู้แช่แข็งที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้เป็นอาหารแก่กุ้งปกติในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจเชื้อไวรัสในตัวอย่างกุ้งปกติที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสสำคัญทั้ง5ชนิดก่อนนำไปให้กุ้งปกติกินแล้วผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกในโรงงานแปรรูป

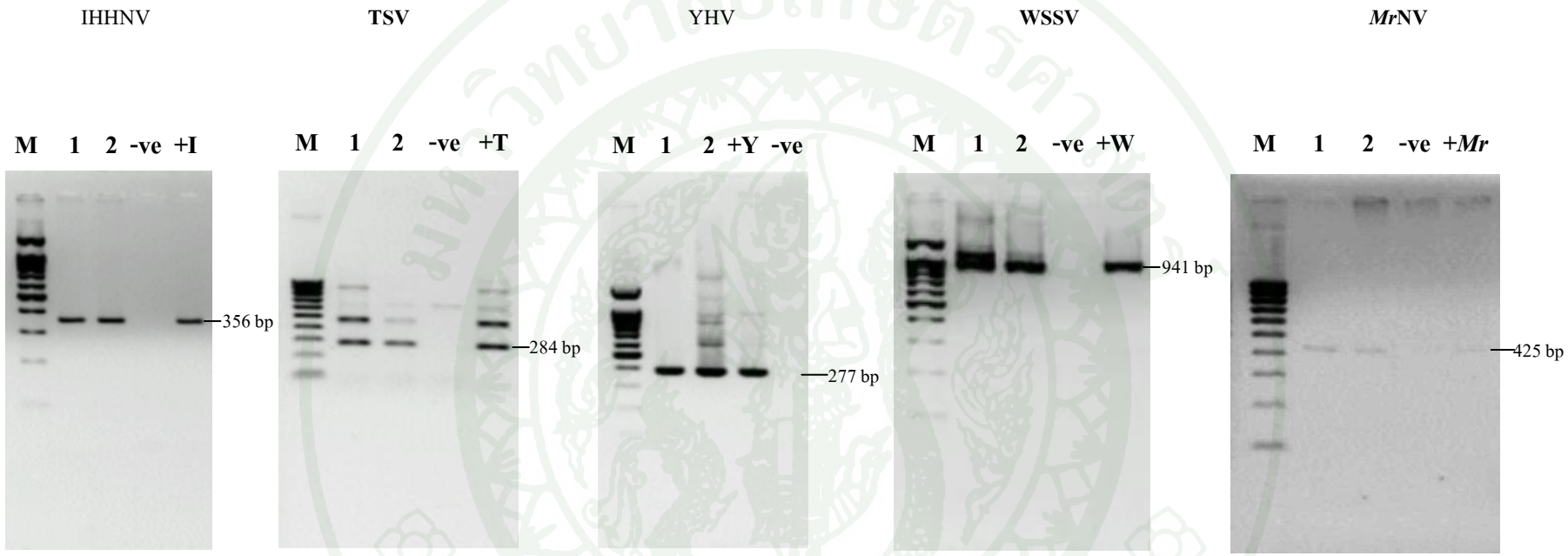
โรค	ผลตรวจ PCR
WSSV	+
YHV	+
TSV	+
IHHNV	+
MrNV	+

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจากการฉีดเชื้อ

ผลการทดลอง จากการให้กุ้งทดลอง (ปลอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด) กินกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสแต่ละโรคโดยการฉีดเชื้อตามที่ระบุไว้ในข้อ 2.1 เป็นอาหารทุกวัน วันละ 2 มื้อ ติดต่อกัน 3 วัน แสดงไว้ในภาพที่ 5 คือพบการติดเชื้อไวรัสในกุ้งตัวอย่างที่ทำการทดสอบทั้ง 5 กลุ่ม จากนั้นผู้วิจัยจึงเก็บตัวอย่างกุ้งทั้งหมดในวันที่ 4 ก่อนที่จะนำกุ้งตัวอย่างแต่ละกลุ่มใส่ในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวไปแปรรูปตามขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกใน ห้องทดลองของ โรงงานแปรรูปที่เป็นสมาชิกของสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย ที่จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเดินทางประมาณ 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 แสดงผลตรวจการติดเชื้อไวรัสหลังจากให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจากการฉีดเชื้อไวรัสสำคัญทั้ง 5 ชนิด ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกพบว่ากุ้งตัวอย่างในแต่ละกลุ่มที่ทำการตรวจมีการติดเชื้อไวรัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

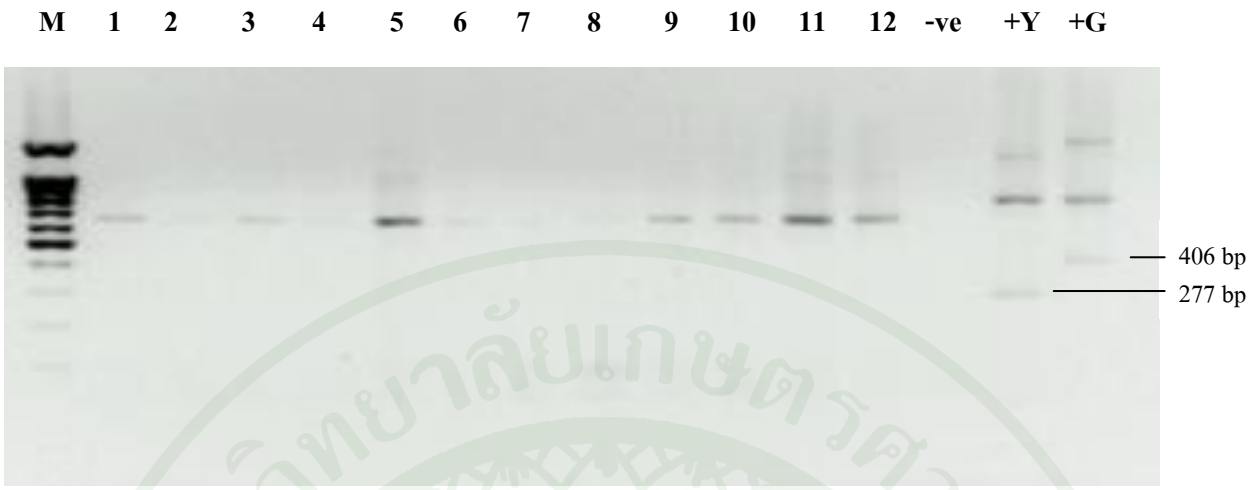
2.3 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากกุ้งที่ผ่านกระบวนการแปรรูป

ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 9 และภาพที่ 4-5 พบว่ากุ้งทดลองในกลุ่มที่ให้กินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส *Mr*NV ก่อนจะนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50 ppm. พบ 1 ตัวอย่างที่ มีการติดเชื้อไวรัส *Mr*NV ในขณะที่กุ้งทดลองที่ให้กินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส *Mr*NV ก่อนจะนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้ายไม่พบการติดเชื้อไวรัสดังกล่าว สำหรับกุ้งในกลุ่มทดลองที่ให้กินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส IHHNV, TSV และ YHV นั้นไม่พบการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวทั้งในกลุ่มที่นำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50 ppm และกลุ่มที่นำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย แสดงว่า กระบวนการมาตรฐานที่โรงงานแปรรูปของไทยใช้ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกนั้นเพียงพอแล้วต่อการป้องกันการถ่ายถอดเชื้อไวรัสทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว ในกุ้งเลี้ยง อย่างไรก็ตามกลุ่มการทดลองที่ให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส WSSV ก่อนนำนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50 ppm. และกลุ่มที่ให้กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย พบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ทั้ง 2 กลุ่มการทดลองแสดงว่ากระบวนการแปรรูปดังกล่าวไม่สามารถป้องกันการถ่ายทอดเชื้อไวรัส WSSV จากผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกที่ติดเชื้อไวรัส WSSV ไปยังกุ้งเลี้ยงได้

ตารางที่ 9 แสดงผลการตรวจการติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากกุ้งปกติที่กินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสแล้วนำไปผ่านขบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ

โรค	ล้างคลอรีน 50 ppm	หลังสิ้นสุดกระบวนการ
WSSV	+	+
YHV	-	-
TSV	-	-
IHHNV	-	-
MrNV	+	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

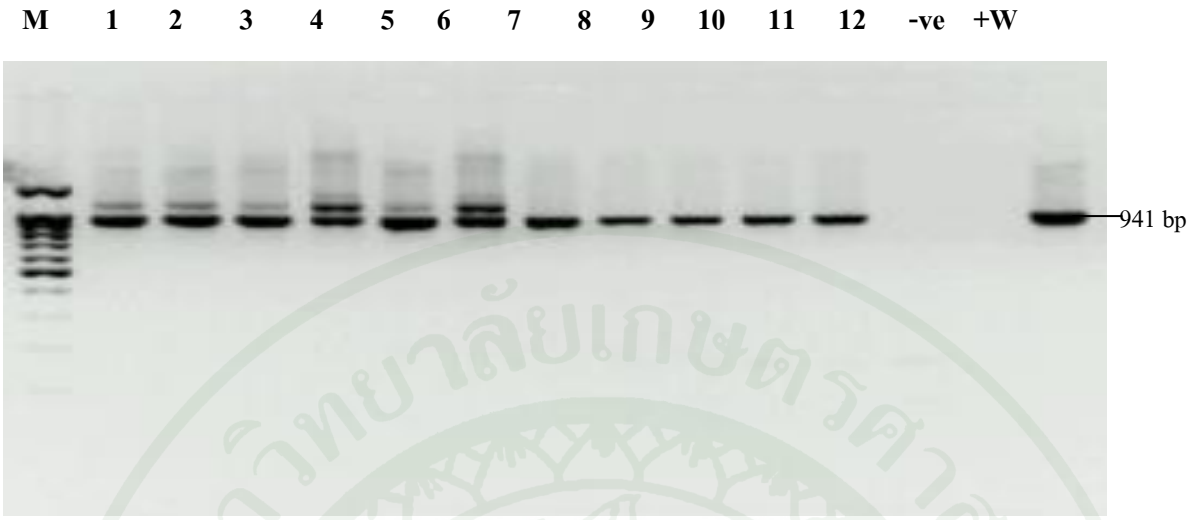


+Y = 277 bp

+G = 406 bp

ภาพที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส YHV และ GAV จากการให้กุ้งปกติ กินกุ้งที่ผ่านขบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และ ปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ M = molecular marker, 1 ถึง 6 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ YHV แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50ppm , 7 ถึง 12 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ YHV แล้วนำไปผ่าน กระบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



+W = 941 bp

ภาพที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส WSSV จากการให้กุ้งปกติ กินกุ้งที่ผ่านขบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ M = molecular marker, 1 ถึง 6 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50ppm , 7 ถึง 12 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย

เนื่องจากผลการทดลองครั้งนี้ให้ผลแตกต่างจากการทดลองแรกที่พบว่าผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกที่ติดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด จากสมาคมอาหารแช่เหยือกแข็งเมื่อนำไปให้กุ้งปกติในห้องปฏิบัติการกินเป็นอาหารก็ไม่พบการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวในกุ้งทดลองทุกกลุ่ม คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส WSSV จากกระบวนการแปรรูปไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการอีกครั้งหนึ่ง โดยผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าการที่ผลการทดลองดังกล่าวมีความแตกต่างกันน่าจะเนื่องมาจากในสภาพความเป็นจริงเวลาเกษตรกรทั่วไปจับกุ้งจะไม่ส่งกุ้งสดจากฟาร์มไปยังโรงงานแปรรูปทันทีแต่จะแช่น้ำแข็งและเก็บไว้ในรถของห้องเย็นที่พร้อมจะลำเลียงไปยังตลาดกลางที่มหาชัย ส่วนมากคือที่ตลาดทะเลไทยโดยใช้ระยะเวลาอีกประมาณ 18-24 ชั่วโมงกระบวนการดังกล่าวนี้น่าจะส่งผลต่อการถ่ายทอดเชื้อไวรัสWSSV ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดลองอีกครั้งหนึ่งโดยให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส WSSV จากนั้นแช่กุ้งเป็นเวลา 1 คืน(24 ชั่วโมง)ในน้ำอุณหภูมิประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับขั้นตอนปกติที่เกษตรกรทั่วไปใช้ก่อนที่จะลำเลียงตัวอย่างดังกล่าวไปยังโรงงานแปรรูปเพื่อนำกุ้งไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือก แล้วนำไปให้กุ้งปกติกินเพื่อตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสชนิดนี้อีกครั้ง ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 10 ภาพที่ 6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจการติดเชื้อไวรัสดวงขาว (WSSV) จากกุ้งปกติที่กินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสแล้วแช่น้ำที่มีอุณหภูมิประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ

เชื้อไวรัส	ล้างคลอรีน 50 ppm	หลังสิ้นสุดกระบวนการ
WSSV	-	-

ภาพที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส WSSV จากการให้กุ้งปกติ กินกุ้งที่แช่น้ำไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านขบวนการแปรรูปเป็นกุ้งถอดหัวผ่าไส้และ ปอกเปลือก ในห้องปฏิบัติการ M = molecular marker, 1 ถึง 3 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วนำไปผ่านขบวนการแปรรูปจนถึงการล้างด้วยคลอรีน 50ppm , 4ถึง 5 = กุ้งที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV แล้วนำไปผ่านขบวนการแปรรูปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการแช่กุ้งในอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปจะส่งผลต่อความสามารถในการติดเชื้อไวรัสWSSV จากผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้และปอกเปลือกที่ติดเชื้อไวรัสWSSV ไปยังกุ้งปกติได้ทั้งนี้น่าจะเนื่องมาจากอวัยวะเป้าหมายที่ไวรัส WSSV จะเข้าไปสะสมและทำลายได้แก่บริเวณ เหงือก หัวใจ ซึ่งอยู่บริเวณใกล้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตับและตับอ่อนของกุ้งซึ่งอวัยวะดังกล่าวมีเอ็นไซม์อยู่หลายชนิดที่มีคุณสมบัติเกี่ยวกับการย่อยสารอาหารต่างๆเป็นจำนวนมากเมื่อแช่กุ้งไว้ในสภาพที่มีอุณหภูมิไม่ต่ำมากระหว่าง 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงทำให้เอ็นไซม์ดังกล่าวถูกปล่อยออกมาส่งผลให้ไวรัส WSSV ที่อยู่บริเวณนั้นตายหรือสูญเสียประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไป ในขณะเดียวกัน อีกบริเวณหนึ่งที่มีไวรัสWSSV สะสมอยู่มากได้แก่เยื่อบุผนังทางเดินอาหาร ซึ่งอวัยวะดังกล่าวอยู่ใกล้กับทางเดินอาหารจึงมีเอ็นไซม์หลายชนิดซึ่งใช้ในการย่อยอาหาร ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากกุ้งตายเป็นเวลานานเช่นเดียวกับบริเวณเนื้อเยื่อใต้เปลือกกุ้งซึ่งมักพบมีปริมาณไวรัสWSSV สะสมอยู่ทำให้ไวรัส WSSV ที่อยู่บริเวณนั้นตายหรือสูญเสียประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไปยังกุ้งปกติ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยจำนวนมากที่แสดงถึงผลของอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการขนส่งและแปรรูปกุ้งจะมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์กุ้งตั้งแต่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันในตัวกุ้ง การย่อยสลายของโปรตีน โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายตัวของเนื้อเยื่อกุ้งเนื่องจากแบคทีเรียที่อยู่ในตัวกุ้งอย่างรวดเร็ว (Bottino *et al*., 1979; Reddy *et al*., 1981; Bhobe and Pai, 1986; Riaz and Qadri,1990) เมื่อเซลล์ในเนื้อเยื่อดังกล่าวเกิดการสลายตัวจะทำให้ไวรัสที่อยู่ในเซลล์นั้นๆตายไปด้วย ประกอบกับในระหว่างการแปรรูปกุ้งเป็นผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวผ่าไส้ และปอกเปลือกนั้นมีการดึงเอาอวัยวะที่มีการสะสมของไวรัส WSSV ออกได้แก่ หัว และลำไส้ พร้อมทั้งใช้คลอรีนในระดับความเข้มข้นต่างๆในการล้างกุ้งอีกหลายครั้งส่งผลให้ไวรัสที่มีอยู่ในตัวกุ้งตายหรือสูญเสียประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไป ประกอบกับมีรายงานว่าเชื้อดวงขาวจะสามารถถูกถ่ายทอดจากพาหะที่ติดเชื้อไปยังกุ้งปกติภายในเวลา 24 ชั่วโมง (Supamattaya *et. al*., 1998) ดังนั้นเมื่อ มีการแช่กุ้งที่ติดเชื้อดวงขาวเป็นเวลาประมาณกว่า 24 ชั่วโมง ทำให้กุ้งที่ติดเชื้อดังกล่าวไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการได้ตามผลการทดลองที่แสดงไว้

ที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาที่สำคัญเกี่ยวกับการทดลองการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากกุ้งแช่แข็งไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการ(Nunan *et al*., 1998; Durand *et al*., 2000; Hasson *et al*., 2006)โดยผลการศึกษาพบว่า เชื้อไวรัสWSSV และ ไวรัสYHV ที่สกัดจากกุ้งแช่แข็งซึ่งติดเชื้อไวรัส ทั้งสองชนิดดังกล่าวเมื่อนำไปฉีดเข้าไปในกุ้งปกติพบว่าการถ่ายทอดเชื้อไวรัสดังกล่าวไปยังกุ้งปกติทำได้ไม่สมบรูณ์ เช่นในรายงานของ Durand *et al* (2000) พบว่า กุ้งปกติที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัส WSSV ที่สกัดจากกุ้งแช่แข็งที่ติดเชื้อไวรัสดังกล่าว มีการติดเชื้อไวรัสจำนวน 4 ตัว จากกุ้งทดลองที่ทำการฉีดเชื้อทั้งหมด 10 ตัว โดยกุ้ง 3 ตัวตายหลังจากฉีดเชื้อและกุ้ง 1 ตัวพบติดเชื้อไวรัสในปริมาณน้อยและไม่ทำให้กุ้งตายในขณะที่กุ้งที่เหลือทั้ง 6 ตัวไม่ตายและไม่พบการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวหลังจากตรวจสอบด้วยวิธี PCR ในขณะที่การทดลองถ่ายทอดเชื้อไวรัส WSSV โดยให้กุ้งปกติกินกุ้งกุ้งแช่แข็งที่ติดเชื้อไวรัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

WSSV โดยให้กุ้งปกติกินที่กุ้งแช่แข็งที่ได้รับเชื้อทุกวันในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วันพบว่ากุ้งทดลองมีการติดเชื้อไวรัสWSSV จำนวน 1 ตัวจาก 10 ตัว การศึกษาดังกล่าวให้ผลคล้ายกับการศึกษาในครั้งนี้ทั้งทั้งที่ วิธีการถ่ายทอดชื้อไวรัสโดยการสกัดไวรัสจากกุ้งแช่แข็งทั้งตัวแล้วฉีดเข้าไปในกุ้งปกตินั้นเป็นการส่งผ่านไวรัสเข้าไปในตัวกุ้งได้เป็นจำนวนมากกว่าการศึกษาในครั้งนี้เพราะการให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสนั้น กุ้งทดลองจะไม่สามารถกินซากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส ทั้งตัวได้ทำให้กุ้งทดลองได้รับเชื้อไวรัสในปริมาณน้อยกว่าการฉีดเชื้อไวรัสเข้าไปโดยตรง อีกทั้งกุ้งทดลองที่ติดเชื้อไวรัสนี้ต้องผ่านกระบวนการแช่ในถังน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงด้วยแล้วทำให้โอกาสการถ่ายทอดเชื้อไวรัสดังกล่าวไปยังกุ้งปกติเป็นไปได้น้อยมากตามผลการศึกษาครั้งนี้ โดยการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากกุ้งแช่แข็งไปยังกุ้งปกติจะเกิดขึ้นได้ต้องขึ้นกับปริมาณของไวรัสในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งและกระบวนการในการแปรรูปผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งดังกล่าวว่าจะสามารถลดปริมาณของไวรัสในตัวกุ้งได้ มากน้อย เพียงไร แนวทางที่ดีที่สุดในการป้องกันการถ่ายทอดเชื้อไวรัสดวงขาวจากผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูปไปยังกุ้งปกติคือถ้าเกษตรกรพบกุ้งในบ่อป่วยจากการติดเชื้อไวรัสดวงขาวแล้ว ควรที่จะเลือกทำการแปรรูปกุ้งเป็นแบบกุ้งต้มหรือวิธีอื่นที่ทำให้สุกซึ่งจะส่งผลให้ไวรัสในตัวกุ้งตายและไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังกุ้งปกติได้ เกษตรกรต้องไม่ใช้วิธีการจับกุ้งเป็นหรือส่งเข้าโรงงานแปรรูปเพื่อทำการแช่เย็นหรือแช่แข็งทันที จะสามารถลดปัญหาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากผลิตภัณฑ์กุ้งไปยังกุ้งปกติได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผลการศึกษา

1.การสำรวจการติดเชื้อไวรัส 5 ชนิดได้แก่ โรคไวรัสดวงขาว (WSSV)โรคไวรัสหัวเหลือง (YHV) โรคไวรัสทอร่า(TSV) โรคไวรัสตัวพิการ(IHHNV) และโรคไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV) ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวปอกเปลือกและผ่าไส้ที่ส่งออกของประเทศไทยจำนวน 100 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2552 ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 พบว่าเชื้อไวรัสที่ตรวจพบมากที่สุดคือ เชื้อไวรัสทอร่า(TSV) โดยตรวจพบทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ตามด้วยเชื้อไวรัสดวงขาว WSSV 8 ตัวอย่าง ไวรัสตัวพิการ(IHHNV) จำนวน 7 ตัวอย่าง ไวรัสหัวเหลือง(YHV) และไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV) พบเท่ากันคือ ชนิดละ 4 ตัวอย่าง

2.การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิดได้แก่ โรคไวรัสดวงขาว (WSSV) โรคไวรัสหัวเหลือง (YHV) โรคไวรัสทอร่า (TSV) โรคไวรัสตัวพิการ(IHHNV) และโรคไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม *(Mr*NV) ในผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวปอกเปลือกและผ่าไส้ที่ส่งออกของประเทศไทยไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิดในผลิตภัณฑ์กุ้งดังกล่าวไม่สามารถถ่ายทอดไปยังกุ้งปกติได้

3.การทดลองฉีดเชื้อไวรัส 5 ชนิดได้แก่ โรคไวรัสดวงขาว (WSSV)โรคไวรัสหัวเหลือง(YHV) โรคไวรัสทอร่า(TSV) โรคไวรัสตัวพิการ (IHHNV) และโรคไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV) เข้าไปในกุ้งปกติเพื่อให้ป่วยจากนั้นนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์กุ้งถอดหัวปอกเปลือกและผ่าไส้ตามขั้นตอนมาตรฐานของโรงงานแปรรูปของไทยก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปให้กุ้งปกติในห้องปฏิบัติการกินเป็นอาหารแล้วทำการทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิด พบว่ากระบวนการในการแปรรูปดังกล่าวสามารถยับยั้งความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส 4 ชนิดได้แก่โรคไวรัสหัวเหลือง (YHV) โรคไวรัสทอร่า (TSV) โรคไวรัสตัวพิการ (IHHNV) และโรคไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลังขาวในกุ้งก้ามกราม (*Mr*NV)จากผลิตภัณฑ์กุ้งที่ติดเชื้อไปยังกุ้งปกติได้ แต่ไม่สามารถลดการถ่ายทอดเชื้อโรคไวรัสดวงขาว (WSSV) จากผลิตภัณฑ์กุ้งดังกล่าวไปยังกุ้งปกติได้

4.การแช่กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสดวงขาว (WSSV) ในน้ำหรือน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิประมาณ 0-4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปสามารถยับยั้งการถ่ายทอดเชื้อไวรัสดวงขาว (WSSV) จากผลิตภัณฑ์กุ้งดังกล่าวไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1.ถ้าเกษตรกรทราบว่ากุ้งในบ่อป่วยเป็นโรคไวรัสดวงขาว (WSSV) และมีความจำเป็นต้องรีบจับกุ้งทันทีควรใช้ขบวนการแปรรูปเป็นกุ้งต้มหรือทำให้สุกเท่านั้น ซึ่งจะทำให้ไม่มีโอกาสที่จะมีการถ่ายทอดเชื้อไวรัสดวงขาวได้

2.ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของกระบวนการแช่ผลิตภัณฑ์กุ้งในน้ำหรือน้ำแข็งที่อุณหภูมิต่างๆภายใต้ระยะเวลาแตกต่างกันต่อประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อไวรัสดวงขาวจากผลิตภัณฑ์กุ้งไปยังกุ้งปกติในห้องปฏิบัติการตลอดจนศึกษาผลกระทบของกระบวนการดังกล่าวต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์กุ้งที่ได้เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นแก่เกษตรกรตลอดจนผู้ที่สนใจให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมในการป้องกันการถ่ายทอดเชื้อไวรัสดวงขาวจากผลิตภัณฑ์กุ้งไปยังกุ้งที่เลี้ยงในฟาร์มต่อไป

3.ในการเลี้ยงกุ้งเกษตรกรควรเลี้ยงกุ้งตามฤดูกาล หลีกเลี่ยงการเลี้ยงในฤดูที่เสี่ยงตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน ถึงกุมภาพันธ์ เกษตรกรควรเลือกใช้ลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen free; SPF) และมีการใช้ระบบ biosecurity system เพื่อป้องกันโรคไวรัสระบาดในระหว่างการเลี้ยง วิธีการดังกล่าวจะสามารถลดปัญหาการระบาดของโรคไวรัสในการเลี้ยงกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กาญจนา แมงทับ. 2547. **การพัฒนาทางอิมมูโนวิทยาการตรวจหาไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จักรพงศ์ นีละมนต์. 2549**. ผลของไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) และ Extra Small Virus (XSV) ในแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามต่อคุณภาพลูกกุ้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, กรุงเทพฯ.

จิราพร เกสรจันทร์, สิทธิ บุณยรัตนผลิน, เรวัตร คงประดิษฐ์ และอุษณีย์ เอกปฏิฐานพงษ์. 2538. **ไวรัสรูปแท่งของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ.** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2538, สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง, สงขลา.

จิรพร สิงหพันธุ์. 2547. **ผลของ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ต่อการเจริญเติบโตและการรอดของกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei* ; Boone, 1931).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ2534. **คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ**.พิมพ์ครั้งที่2. โรงพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ จำกัด,กรุงเทพฯ.

_____. 2543. **กุ้งไทย 2000 สู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม**. โรงพิมพ์เจริญรัฐ การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

_____ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย**. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

_____ นิติ ชูเชิด และ ปิยนุช พรมภมร . 2550. **โรคตัวพิการและโรคทอร่าในกุ้งขาวแวนนาไม และลักษณะที่คล้ายกับโรคทั้งสองชนิด.** เอกสารเผยแพร่สำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง. หน่วยวิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิติ ชูเชิด. 2541. **การศึกษาประสิทธิภาพของฟอร์มาลินในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ.** รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปี 2541 โครงการวิจัยรหัส ท-ม 4.41. 17 น.

ประจวบ หลำอุบล. 2547. **การรวบรวมวิเคราะห์และสังเคราะห์งานวิจัยกุ้งทะเลของประเทศไทย.** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ปิยนุช พรมภมร. 2550. โรคสำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาวแปซิฟิกในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สว่าง ไหวพริบ. 2532. **โรคกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* FABRICIUS ในบ่อเลี้ยง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สิทธิ บุณยรัตนผลิน, สถาพร ดิเรกบุษราคม, จิราพร เกสรจันทร์, อุษณีย์ เอกปณิธารพงศ์, ไชยยุทธ์ จันทนาชูกลิ่น และกิจการ ศุภมาตย์. 2535. **Baculovirus สาเหตุของโรคกุ้งหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ.** รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2535. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

สิริลักษณ์ เจริญผล. 2545. **การโคลนยีนและผลิตโปรตีนโครงสร้างส่วนสำคัญของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุปราณี ชินบุตร. 2546. **การผลิตกุ้ง.** กรมประมง. กรุงเทพฯ.

สุเทพ สุวรรณหงส์. 2546. **ประสิทธิภาพของฟอร์มาลินในการควบคุมโรคไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุธี วงศ์มณีประทีป. 2553. **ผลของอุณหภูมิต่อความรุนแรงของไวรัสดวงขาว (White Spot Syndrome Virus) ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ 2552. **การวิเคราะห์ความเสี่ยงนำเข้า ใน : การวิเคราะห์ความเสี่ยงอาหาร เล่ม 1.** สำนักพิมพ์ ตีรณสาร. กรุงเทพฯ.

ศุภมาศ ศรีวงศ์พุก. 2549. **ผลกระทบของการติดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus และ Extra Small Virus ต่อการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (de Man): อัตราการรอดตาย และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Arcier, J.M., F. Herman, D.V. Lightner, R.M. Redman, J. Mari and J.R. Bonami. 1999. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Dis. Aquat. Org.** 38: 177-181.

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

_____ and D.V. Lightner. 1988. **A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology.** World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

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

Bhobe, A. M. and J. S. Pai. 1986. Study of the properties of frozen shrimps. **J. Food Sci. and Tech.** 23: 143–147.

Bottino, N. R., M. L. Lilly and G. Finne. 1979. Fatty acid stability of Gulf of Mexico brown shrimp (*Penaeus aztecus*) held on ice in frozen storage. **J. Food Sci**. 44: 1778–1779.

Brock, J.A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei***. Publ. By the Oceanic Institute, Makapu point, Honolulu, HI, USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Brock, J.A., R.B. Gose, D.V. Lightner and H.W. Hasson. 1997. Recent developments and an overview of Taura syndrome of farmed shrimp in the Americas. pp. 267-283. *In*: T.W. Flegel, I.H. MacRae (eds) **Diseases in Asian Aquaculture III**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines

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

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

Cowley, J.A., C.M. Dimmock, K.M. Spann and P.J. Walker. 2000. Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. **J. Gen. Virol.** 81: 1473-1484.

Dhar, A.K., M.M. Roux, and K.R. Klimpel. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. **J. Clin. Microbiol. 39:** 28352845.

Durand, S.V., K.F.J. Tang and D.V. Lightner. 2000. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. **J. Aquat. An. Hlth**. 12: 128–135.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Flegel, T.W., S. Sriurairatana, C. Wongterrasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim and B. Withyachumnarnkul. 1995. Progress in characterization and control of yellowhead virus of *Penaeus monodon*. pp. 76-83. *In* C.L. Browdy and J.S. Hopkins (eds). **Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

_____. 1997. Major viral disease of the black tiger prawn (*Penaeus moonodon*) in Thailand. **World Journal Microbiology Biotechnol.** 13: 433-442.

_____, L. Nielsen and W. Sang-oum. 2003**. Outbreaks of Taura syndrome virus(TSV) with exotic *Penaeus vannamei* cultivated in Thailand JSPS-NRCT international symposium**. Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Rayong, Thailand.

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

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

_____ , D.V. Lightner, L.L. Mohney, R.M. Redman and B.M. White. 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura symdrome virus (TSV) infection in *Prnaeus vannamei.* **Dis. Aquat. Org.** 38: 93-105

_____ , Y. Fan, T.Reisinger, J. Venuti and P.W. Varner. 2006. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen bait-shrimp. **Dis. Aquat. Organ**. 71: 91–100.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hsu, H.C., C.F. Lo, S.C. Lin, K.F. Liu, S.E. Peng, Y.S. Chang, L.L. Chen, W.J. Liu and G.H. Kou. 1999. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. **Dis. Aquat. Org.** 39: 13-9.

Hulten, V.,M. Westenberg, Stephen D. Goodall, and Just M. Vlak. 2000a. Identification of two major structural proteins of white spot syndrome virus of shrimp. **Virology.** 266: 227-236.

_____ , W. Rob Goldbach and Fust M. Vlak. 2000b. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. **J. Gen. Virol.** 81: 2525-2529.

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

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

Jimenez, R. 1992. **Sindrome de Taura (Resumen)**. Acuacultura del Ecuador: 1-16.

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

_____ and S.K. Otta. 1998. Disease problems affecting cultured penaeid shrimp in India. **Fish Pathol.** 33: 413-419.

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

Kim, C.K., P.K. Kim, S.G. Sohn, D.S. Sim, M.A. Park, M.S. Heo, T.H. Lee, J.D. Lee, H.K. Jun and K.L. Jang. 1998. Development of a polymerase chain reaction (PCR) procedure for the detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp. **J. Fish Dis.** 21: 11-17.

Kimura, T., K. Yamano, H. Nakano, K. Momoyama, M. Hiraoka and K. Inouye. 1996. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. **Fish Pathol.** 31: 93-98.

Lightner, D.V. 1996. **A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedurres for Disease of Culture Penaeid Shimp.** World Aquaculture. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

_____, R.M. Redman, D.A. Danald, R.R. Williams and L.A.Perez. 1984. **Major diseases encountered in controlled environment culture of penaeid shrimp at Puerto Penasco, Sonora, Mexico.**

_____ , R.M. Redman, T.A. Bell, and J.A. Brock. 1983. Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamai* imported into Hawaii. **J. World Mariculture Soc.** 14: 212-225.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Limsuwan, C. 1991. **Handbook for Cultivation of Black Tiger Prawns**. Tansetakit Co. Ltd.

Loh, P.C., E. Cesar, B. Nadala Jr., L.M. Tapay and Y. Lu. 1998. Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. pp. 255-259. *In* T.W. Flegel (ed). **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

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

Loh, P.C., E.C.B. Nadala Jr, L.M. Tapay and Y. Lu. 1998. Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In: Flegel, T.W. (Ed.), **Advances in Shrimp Biotechnology.** National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand.

Lotz, J.M. 1997. Special topic review: Virus, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. **World J. of Microbiology.** 13: 405-413.

Mari, J., J.R. Bonami, and D.V. Lightner. 1998. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. **Dis. Aquat Org.** 33:11-17.

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

Nadala, E.C., L.M. Tapay and P.C. Loh. 1997b. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 31: 141-146.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nakano, H., H. Koube, S. Umezawa, K. Momoyama, M. Hiraoka, K. Inouye and N. Oseko. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trails. **Fish Pathol.** 29: 135-139.

Nash, G, S. Chinabut and C. Limsuwan 1987. Idiopathic muscle necrosis in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man, cultured in Thailand. **J. Fish Dis. 10:**109–120

Nunan, L.M. and D.V. Lightner. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **J. Virol. Methods** 63: 193-201.

_____ , B.T. Poulos, D.V. Lightner. 1998. The detection of white spot syndrome virus WSSV and yellow head virus YHV in imported commodity shrimp. **Aquaculture.** 160: 19–30.

OIE. 2008. **OIE Listed Diseases**. Animal health in the world. Available Source: http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2008/ 26 February 2010

Qian, D., Z. Shi., S. Zhang., Z. Cao., W. Liu.,L. Li, Y. Xie, I. Cambournac and J.R. Bonami. 2003. Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Fish Dis.** 26: 521-527.

Reddy, S. K., Nip, W. K. and C. S. Tang. 1981. Changes in fatty acids and sensory quality of fresh water shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*) stored under frozen conditions. **J. Food Sci**. 46: 353–356.

Riaz, M. and R. B. Qadri. 1990. Time–temperature tolerance of frozen shrimp 2. Biochemical and microbiological changes during storage of frozen glazed shrimps. **Trop. Sci.** 30(4): 343–356.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Romestand, B. and J.R. Bonami. 2003. A sandwish enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of *Mr*NV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Fish Dis.** 26: 71-75.

Shahadat, H.S., C. Amirban, J. Biju, S.K. Otta, K. Indrani and K. Iddya . 2001. Detection of new hosts for Write spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture.** 198: 1-11.

Sindermann, C.L. and D.V. Lightner (eds). 1988. **Disease Diagnosis and Control in North Amarican Marine Aquaculture.** Elsevier Science, New York. 431 p.

Soowannayan, C., T.W. Flegel, P. Sithigorngul, J. Slater, A. Hyatt, S. Crameri, T. Wise, M.S. Crane, J.A. Cowley and other authors. 2003. Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. **Dis. Aquat. Org. 57**, 193–200.

Spann, K.M., J.E. Vickers and R.J.G. Lester. 1995. Lymphoid organ t virus of *Penaeus monodon* from Australia. **Dis. Aquat. Org. 23:** 127-134

_____, JA Cowley, Walker PJ, Lester RJG. 1998. A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. **Dis Aquat Org.31:** 169-179.

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

Tang, K.F.J and D.V. Lightner. 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for in situ hybridization. **Dis. Aquat. Org.** 35: 165-73.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tang, K.F.J and D.V. Lightner. 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Dis. Aquat. Org. 44:** 79–85

_____ , K.M. Spann, L. Owens and D.V. Lightner. 2002. *In situ* detection of Australian gill associated virus with a yellow head virus gene probe. **Aquaculture** 205: 1-5.

Thai Royal Frozen. 2011. **Our Products**. Available Source: http://www.thairoyalfrozen.com/product.html 1 May 2011

Tung, C.W., C.S. Wang. and S.N. Chen. 1999**.** Histological and electron microscopic study on *Macrobrachium rosenbergii* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), culture in Taiwan. **J. Fish Dis.** 22: 319-323.

Vlak, J.M., J.R. Bonami, T.W. Flegel, H.K. Guang, D.V. Lightner, C.F. Lo, P.C. Loh and P.J. Walker (2002) Nimaviridae. **A new virus family infecting aquatic invertebrates.** Report from the XIIth Int Congr Virol, Paris. Oral and poster presentation

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

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

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

_____, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumanarnkul and T.W. Flegel. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. **Dis. Aquat. Org.** 31: 181-186

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

Yokanandhan, K, M. Leartvibhas, S. Sriwongpuk and C. Limsuwan. 2006. White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rasenbergii* in Thailand**. J. Aquatic. Org.** 69: 255-258.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสกัดเชื้อไวรัส IHHNV จากเหงือกกุ้งหรือรยางค์ขาว่ายน้ำ

ตัวอย่างกุ้งที่ใช้เตรียม ต้องผ่านการตรวจไวรัสทั้งหมดด้วยวิธี PCR แล้วพบว่ามีการติดเชื้อ IHHNV เพียงชนิดเดียว เตรียมเหงือกกุ้งและระยางค์ขาว่ายน้ำติดเชื้อ IHHNV ชั่งน้ำหนักให้ได้ตามต้องการ จากนั้นแบ่ง LHM ใส่หลอด โดยคำนวณให้ได้อัตราส่วนเนื้อเยื่อกุ้ง :LHM = 1:10 (เหงือกกุ้งและ รยางค์ขาว่ายน้ำ 1 กรัม : LHM 9 mL) ใส่เหงือกกุ้งและ รยางค์ขาว่ายน้ำลงในโกร่งที่แช่อยู่ใน ice bath แล้วเติม LHM ที่เย็น (4 องศาเซลเซียส) จากหลอดที่เตรียมไว้ลงไปให้ได้อัตราส่วน เหงือกกุ้งและรยางค์ขาว่ายน้ำ1 กรัม:LHM 1 mL บดเหงือกกุ้งในโกร่งให้ละเอียด โดยแช่โกร่งใน ice bath ตลอดเวลา เติม LHM ที่เหลือทั้งหมดลงในเหงือกกุ้งที่บดแล้ว นำไปปั่นแยกตะกอน (cell debris) ออกด้วย refrigerate centrifuge อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 4,000 g นาน 15 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร

การสกัดเชื้อไวรัส YHV จากเหงือกกุ้งหรือรยางค์ขาว่ายน้ำ

แยกเชื้อ YHV จากกุ้งป่วยซึ่งได้ตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วยการใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) รวมทั้งตรวจสอบว่ากุ้งที่ติดเชื้อดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนเชื้ออื่น แล้วนำกุ้งที่ติดเชื้อมาแยกเหงือกและนำมาบดในTN buffer (20 mM Tris-HCL, 400 mM NaCl, pH 7.4) ในอัตราส่วน1 : 10 (w/v) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องcentrifuge ที่ 3,000 X g เป็นเวลา20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนของเหลวใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge อีกครั้งหนึ่ง ที่อัตรา8,000 X g เป็นเวลา30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนของเหลวใสที่ได้(supernatant) มากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งสารละลายใส่หลอด หลอดละ 50 มิลลิลิตร และจัดเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การสกัดเชื้อไวรัส WSSV จากเหงือกกุ้งหรือรยางค์ขาว่ายน้ำ

การสกัดไวรัส สำหรับการเตรียมสารละลาย WSSV ซึ่งเตรียมจากเนื้อเยื่อใต้เปลือกบริเวณ cephalothorax รวมทั้งเหงือกและกล้ามเนื้อมาบดใน TN buffer (20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7.4) ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV 1 กรัมต่อ TN buffer 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่งที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสารละลายส่วนใสมา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อที่มีขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งจะผ่านได้เฉพาะไวรัสเท่านั้นเก็บสารละลายที่มี WSSV ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ข้อควรระวัง: การสกัดเชื้อไวรัสทุกขั้นตอนต้องทำในที่เย็นตลอดเวลา โดยแช่เหงือกกุ้งติดเชื้อ และอุปกรณ์ต่างๆใน ice bath รวมถึงขั้นตอนนำเชื้อไป centrifuge

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวจิตรา บุญยงค์
เกิดวันที่	26 กุมภาพันธ์ 2530
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์