

การตรวจหาเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* โดยวิธีทางอณูชีววิทยาในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่
อาศัยในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Molecular Biological Screening of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Aquatic Macrofauna
in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Pond

–Mr. Phichanont Chiyansuvata



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาเชื้อ <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> โดยวิธีทางอณูชีววิทยาในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่อาศัยในบ่อ เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม
โดย	นายพิชานนต์ จิยังศ์วัต
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันช่อ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สมศักดิ์ ภัคภิณโณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันช่อ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี่)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล)

พิชานนท์ จิยังศ์วัต : การตรวจหาเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* โดยวิธีทางอณูชีววิทยาในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่อาศัยในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (Molecular Biological Screening of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Aquatic Macrofauna in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Pond) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. สพ.ญ. ดร.นันทริกา ชันช้อย, หน้า.

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย โรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายและส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย คือปัญหากลุ่มอาการโตช้าในกุ้งกุลาดำ (Monodon Slow Growth Syndrome, MSGS) และโรคตายด่วน (Early Mortality Syndrome, EMS) ซึ่งพบว่ามีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *Enterocytozoon hepatopenaei* ร่วมด้วย และมีรายงานการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไมเท่านั้น แต่ยังไม่มีการศึกษาการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ในสัตว์น้ำอื่นๆ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ (aquatic macrofauna) ที่อยู่ภายในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมว่าสามารถติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ โดยใช้วิธีการตรวจทางอณูชีววิทยา โดยทำการศึกษาในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง จำนวน 4 ฟาร์ม แบ่งเป็นฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ฟาร์ม และฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2 ฟาร์ม ทำการตรวจหาการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ในกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ ดิน และน้ำที่ใช้เลี้ยงในวันที่เริ่มเลี้ยงและวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง ผลการศึกษาพบว่าพบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ปูนา (*Sayamia Bangkokensis*) ปูแสมก้ามแดง (*Episesarma mederi*) ปูแสมก้ามม่วง (*E. versicolor*) และ ปูแป้น (*Varuna litterata*) เมื่อทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบเชื้อ *E. hepatopenaei* ภายในท่อตับและตับอ่อน จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สัตว์น้ำขนาดใหญ่นอกจากกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำแล้ว ยังสามารถพบการติดเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ชนิดอื่นได้ ซึ่งแสดงว่าสัตว์เหล่านี้มีโอกาสที่จะเป็นพาหะของเชื้อ *E. hepatopenaei* ผลการศึกษาในครั้งนี้พบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ในสัตว์น้ำชนิดอื่นเป็นครั้งแรกของประเทศไทย

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

5575341231 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS: ENTEROCYTOZOOM HEPATOPENAEI / MICROSPORIDIA / PACIFIC WHITE SHRIMP / AQUATIC / MACROFAUNA

PHICHANONT CHIYANSUVATA: Molecular Biological Screening of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Aquatic Macrofauna in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Pond. ADVISOR: ASSOC. PROF. NANTARIKA CHANSUE, Ph.D., pp.

Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and black tiger prawn (*Penaeus monodon*) have been significant key species in Thailand agro industry. Monodon Slow Growth Syndrome (MSGS) and Early Mortality Syndrome (EMS) epidemics have been causing tremendous damage to the industry. There were reports on the co-infection of *Enterocytozoon hepatopenaei*, a microsporidian with these outbreaks in shrimp but no report on other species co-existing in shrimp pond. This research aims to study the infection of *E. hepatopenaei* in other aquatic macrofauna co-existing in shrimp ponds by molecular technique. The study was conducted in 4 shrimp farms in Chachoengsao province 2 farms and Chanthaburi province 2 farms. Samples of shrimp, aquatic macrofauna, soil and water were collected on the beginning and harvest of the crops. The results indicated that *E. hepatopenaei* was evident in 5 species of aquatic macrofauna : giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), thai vinegar crab (*Episesarma mederi*), violet vinegar crab (*E. versicolor*), rice-field crab (*Sayamia bangkokensis*) and green tidal crab (*Varuna litterata*). Histopathological results showed the evidence of *E. hepatopenaei* in hepatopancreatic lumen. In summary, the *E. hepatopenaei* could be infected not only in shrimp, but also, in other macrofauna living in the same ponds. These could possibly be passage for infection by vectors. This is the first report on the infection of *E. hepatopenaei* in aquatic macrofauna. .

Department: Veterinary Medicine

Student's Signature

Field of Study: Veterinary Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันช่อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อีกทั้ง รศ.น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ ซึ่งให้คำปรึกษาแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี่ ที่อนุเคราะห์และให้ความรู้ในกระบวนการทางอนุชีววิทยาและความรู้ทางปรสิต ขอขอบพระคุณ น.สพ.เกรียงไกร เล็กสกุลไชย ที่ให้คำแนะนำและความรู้ในการจัดการฟาร์มและการเลี้ยงกิ้ง ขอขอบพระคุณ สพ.ญ. ฐนิตา เหนือระกูล และ น.ส.สุภมาส แซ่เฮงที่ให้คำปรึกษาแนะนำในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างการทำการวิจัยรวมทั้งเจ้าหน้าที่จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ขอขอบพระคุณ เจ้าของฟาร์มเลี้ยงกิ้งที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ช่วยกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษาเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund)) ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บิดามารดาและน้องสาว ที่คอยเป็นแรงผลักดันช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และสนับสนุนตลอดมา จนทำให้ข้าพเจ้าสำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 สมมติฐานในการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับกุ้งขาวแวนนาไม	4
2.1.1 ลักษณะกุ้งขาวแวนนาไมและถิ่นที่อยู่อาศัย.....	4
2.1.2 สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม	5
2.2 โรคติดเชื้อที่พบในกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย	5
2.2.1 เชื้อไวรัส.....	5
2.2.2 เชื้อแบคทีเรีย.....	6
2.2.3 เชื้อรา.....	6
2.2.4 เชื้อโปรโตซัว.....	6
2.3 การติดเชื้อไม่โครสปอริเดีย.....	7

2.3.1 การแพร่กระจายตัวของเชื้อ	8
2.3.2 การเคลื่อนที่ของปรสิตตามระยะการพัฒนาการของโฮสต์ (localization of the parasite during host development)	9
2.3.3 กลไกการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์โฮสต์ (mechanisms of parasite migration within the host)	10
2.3.4 วิธีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย	10
2.4 การติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกึ่ง	11
2.5 การตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดียในสิ่งมีชีวิต	13
2.5.1 การย้อมด้วยเทคนิคสีพิเศษ (modified trichrome stain)	13
2.5.2 การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (chemofluorescent optical brightening)	14
2.5.3 เซลล์วิทยา (cytology)	14
2.5.4 จุลพยาธิวิทยา (histopathology)	15
2.5.5 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy)	15
2.5.6 อนุชีววิทยา (molecularbiology)	15
2.5.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)	16
2.5.8 การตรวจทางซีรัมวิทยา (serological testing)	16
2.6 การเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดีย	16
2.6.1 การเก็บตัวอย่างดิน	16
2.6.2 การเก็บตัวอย่างน้ำ	17
2.7 การแพร่เชื้อ (transmission of disease)	20
2.7.1 การติดต่อทางตรง (direct contact)	20
2.7.2 การติดต่อทางอ้อม (indirect contact)	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	22

3.1	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	22
3.2	วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษา.....	26
3.2.1	การเก็บตัวอย่างกุ่ม.....	26
3.2.2	การเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่	26
3.2.3	การเก็บตัวอย่างน้ำและดินในบ่อ.....	26
3.3	การสกัดดีเอ็นเอ	27
3.3.1	การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ	27
3.3.2	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำ.....	28
3.3.3	การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน	28
3.4	ตรวจสอบการติดเชื้อ <i>E. hepatopenaei</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	29
3.5	การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis.....	30
3.6	การทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้บริสุทธิ์	30
3.7	การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing).....	30
3.8	การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology)	31
3.9	การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope: TEM).....	31
3.10	การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	32
บทที่ 4	ผลการทดลอง.....	33
4.1	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	33
4.1.1	ขนาดและน้ำหนักของกุ่มในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง	33
4.1.2	ชนิดสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบ	37
4.1.3	ลักษณะน้ำและดิน	42
4.3	การตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing).....	50

4.4 การแปลผลทางลักษณะจุลพยาธิวิทยา.....	56
4.4.1 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างกึ่ง.....	56
4.5 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope: TEM) ในกึ่งขาวแว่นาไม.....	63
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย ข้อเสนอและข้อเสนอแนะ	66
5.1 อภิปรายผลการวิจัย.....	66
5.1.1 ศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด <i>E. hepatopenaei</i> ในกึ่งและสัตว์น้ำขนาดใหญ่	66
5.1.2 การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อในฟาร์ม	68
5.1.3 การศึกษาเปรียบเทียบขนาดความยาวและน้ำหนักของตัวกึ่ง	69
5.1.4 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา.....	70
5.1.5 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....	72
5.1.6 การศึกษาด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในกึ่งและสัตว์น้ำขนาดใหญ่	74
5.1.7 ศึกษาทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction :PCR) ในตัวอย่างดินและน้ำ	74
5.2 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	76
.....	78
รายการอ้างอิง	78
ภาคผนวก.....	87
ภาคผนวก ก ข้อมูลการเลี้ยงกึ่ง.....	88
ภาคผนวก ข ผลการตรวจคุณภาพน้ำ	90
ภาคผนวก ค ตารางสรุปผลการตรวจหาเชื้อ <i>E. hepatopenaei</i>	92
ภาคผนวก ง ภาพการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ <i>E. hepatopenaei</i>	94
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	118

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยและสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของความยาวและน้ำหนักของตัวกุ้ง ระยะเต็มวัย(n=100).....	35
ตารางที่ 2 ลักษณะของน้ำในบ่อตัวอย่าง.....	42
ตารางที่ 3 ลักษณะของดินในบ่อตัวอย่าง	42
ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ <i>E. hepatopenaei</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลิเมอ เรสจากตัวอย่างของฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1.....	45
ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ <i>E. hepatopenaei</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอ เรสจากตัวอย่างของฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2.....	46
ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ <i>E. hepatopenaei</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอ เรสจากตัวอย่างของฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1.....	47
ตารางที่ 7 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ <i>E. hepatopenaei</i> ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอ เรสจากตัวอย่างของฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2.....	48
ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 294 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลาวาของ ฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2.....	50
ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 357 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งระยะโตเต็มวัยจากฟาร์ม ในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2.....	50
ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 286 คู่เบสจากตัวอย่างปูนาจากฟาร์มในจังหวัด ฉะเชิงเทรา 1.....	51
ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 229 คู่เบสจากตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากฟาร์มจังหวัด ฉะเชิงเทรา 1.....	51
ตารางที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 282 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปูนาจากฟาร์มจังหวัด ฉะเชิงเทรา 2.....	52
ตารางที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 171 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากฟาร์มใน จังหวัดฉะเชิงเทรา 2.....	52

ตารางที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 228 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปุ๋ยผสมก้ามมวงจากฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี 1	52
ตารางที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 171 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปุ๋ยแ่้นจากฟาร์มจังหวัด จันทบุรี 1	53
ตารางที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 290 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปุ๋ยผสมก้ามแดงจากฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี 2	53
ตารางที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปุ๋ยแ่้นจากฟาร์มจังหวัด จันทบุรี 2	53
ตารางที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างดินจากฟาร์มจังหวัด ฉะเชิงเทรา 1	54
ตารางที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างดินจากฟาร์มจังหวัด ฉะเชิงเทรา 2	54
ตารางที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 262 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างดินจากฟาร์มจังหวัด จันทบุรี 1	55
ตารางที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 292 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างดินจากฟาร์มจังหวัด จันทบุรี 2	55

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 1.....	22
ภาพที่ 2 แผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 2.....	23
ภาพที่ 3 แผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 1.....	24
ภาพที่ 4 แผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 2.....	25
ภาพที่ 5 แผนผังการกำหนดจุดการเก็บตัวอย่างดินและน้ำ ตามวิธีของ Boyd (1990).....	27
ภาพที่ 6 ความแตกต่างของขนาดกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อเดียวกันและตรวจพบการติดเชื้อ <i>E. hepatopenaei</i> ในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1 ที่กุ้งมีขนาดไม่แตกต่างกัน (A) เปรียบเทียบกับฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2 ที่แสดงถึงความแตกต่างของขนาดที่ชัดเจน (B).....	36
ภาพที่ 7 ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 1 A. ปูนา, B. กุ้งก้ามกราม, C. ปลากินยุง, D.: หอยโข่ง และ E.: ปลานิล.....	38
ภาพที่ 8 ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2 A. ปูนา, B. กุ้งก้ามกราม, C. ปลากินยุง, D. ปลาบู่ใส และ E. ปลานิล.....	39
ภาพที่ 9 ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1 A. ปูแสมก้ามม่วง, B. ปลาบู่, C. ปลาหมอเทศ, D. หอยถ่าน และ E. ปูแป้น.....	40
ภาพที่ 10 ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 2 A. ปูแสมก้ามแดง, B. ปลาบู่, C. ปลาดุกแตงหิน, D. หอยขี้กา และ E. ปูแป้น.....	41
ภาพที่ 11 แสดงตัวอย่างน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว A : จังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 1, B : จังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2, C : จังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1, D : จังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 2.....	43
ภาพที่ 12 แสดงตัวอย่างดินในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว A : จังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 1, B : จังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2, C : จังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1, D : จังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 2.....	44
ภาพที่ 13 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างกุ้งที่ตรวจไม่พบเชื้อ <i>E.hepatopenaei</i> โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติจากตัวอย่างกุ้งฟาร์มจังหวัดจันทบุรีที่ 1 ที่กำลังขยาย 40 เท่า.....	57

ภาพที่ 14 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างกึ่งที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E. hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติพบ E: e-cell (ลูกศรชี้)ภายในท่อตับและตับอ่อนของตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 1 ที่กำลังขยาย 400 เท่า..... 57

ภาพที่ 15 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างกึ่งที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E.hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติพบ B: B-cell, R: R-cell และ F:F cell(ลูกศรชี้)ภายในท่อตับและตับอ่อนของตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 1 ที่กำลังขยาย 400 เท่า 58

ภาพที่ 16 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* (ลูกศรชี้) แทรกอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 2 ที่กำลังขยาย 400 เท่า..... 58

ภาพที่ 17 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* (ลูกศรชี้) แทรกอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 1 ที่กำลังขยาย 400 เท่า 59

ภาพที่ 18 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* (ลูกศรชี้) แทรกอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อน, E: e-cell ที่พบภายในท่อตับและตับอ่อนของตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 1 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า..... 59

ภาพที่ 19 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 2 (ลูกศรชี้) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า 60

ภาพที่ 20 แสดงลักษณะการตอบสนองของร่างกายกึ่งของร่างกายกึ่งเมื่อการความเสียหายที่ตับและตับอ่อน(ลูกศรชี้) HF:hemocytic infiltration เม็ดเลือดแทรกตัวมากขึ้นภายในช่องว่างระหว่างท่อตับและตับอ่อนของตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ที่กำลังขยาย 400 เท่า..... 60

ภาพที่ 21 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างปูแป้นที่ตรวจพบเชื้อ *E.hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติ พบการสะสมของเม็ดไขมัน FV:fat vacuole (ลูกศรชี้) แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อนที่กำลังขยาย 400 เท่า 61

ภาพที่ 22 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างปูแป้นที่ตรวจพบเชื้อ *E.hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติพบนิวเคลียสของโฮสต์ที่เยื่อบุท่อตับและตับอ่อน (ลูกศรชี้) HN:Host nuclei ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า 62

ภาพที่ 23 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ภายในท่อตับและตับอ่อนของปูแป้นที่พบในฟาร์มกึ่งจังหวัดจันทบุรี 1 ที่ (ลูกศรชี้), ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า..... 62

ภาพที่ 24 เซลล์ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกิ้งที่พบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ลูกศรชี้) ระยะเวลา early plasmodium ของสปอร์ที่ภายในยังไม่สามารถมองเห็นออร์แกเนลล์ของสปอร์ได้อย่างชัดเจน อยู่ในช่วงการพัฒนาให้เกิดโครงสร้างภายในสปอร์แทรกตัวอยู่ในไซโตพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ตามแถบมาตราส่วน 1 ไมโครเมตร..... 64

ภาพที่ 25 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกิ้งที่พบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน สปอร์ระยะ early plasmodium สามารถเห็นขอบเขตของผนังสปอร์ 2 ชั้น (double layer nuclear membrane) ซึ่งแยกตัวออกจากกันอย่างชัดเจน แบ่งออกเป็นผนังชั้นนอกและผนังชั้นใน EX:exospore ผนังด้านนอกของสปอร์ที่ติดต่อลำแสงอิเล็กตรอน EN:endospore ผนังภายในของสปอร์ที่โปร่งต่อลำแสงอิเล็กตรอน ภายในยังไม่สามารถมองเห็นออร์แกเนลล์ของสปอร์ได้อย่างชัดเจน อยู่ในช่วงการพัฒนาให้เกิดโครงสร้างภายในสปอร์ซึ่งจะพบสปอร์ที่ปล้ำแสงอิเล็กตรอน ตามแถบมาตราส่วน 200 นาโนเมตร 65



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงและแปรรูปสัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล การเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น มักก่อให้เกิดอุบัติการณ์ของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อและโรคไม่ติดเชื้อตามมา ส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากการบริหารจัดการฟาร์มที่ไม่เหมาะสม รวมทั้งการเลี้ยงกุ้งหนาแน่นมากเกินไปที่อาจส่งผลต่อคุณภาพน้ำและการจัดการในบ่อได้ (Lightner, 1985) สำหรับการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยนิยมเลี้ยงกุ้ง 2 ชนิด คือ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ซึ่งเป็นกุ้งท้องถิ่นของประเทศ และกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่นำเข้ามาจากประเทศทางทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในเอเชีย เริ่มเมื่อประมาณปี พ.ศ. 2541 โดยประเทศไต้หวันเป็นประเทศแรกที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดนี้ สำหรับในประเทศไทยเริ่มมีการนำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงในปี พ.ศ. 2541 เนื่องจากปัญหากลุ่มอาการโตช้าในกุ้งกุลาดำ (Monodon slow growth syndrome, MSGS) เพื่อชดเชยการสูญเสียอุตสาหกรรมการผลิตกุ้ง (Senanan et al., 2007) จนกระทั่งใน ปี พ.ศ. 2545 พบการระบาดของกลุ่มอาการทอรา (Taura syndrome) ส่งผลต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งขาว ทำให้ผลผลิตลดลง เนื่องจากกุ้งตายเป็นจำนวนมาก จัดเป็นอุบัติการณ์ของโรคที่ไม่เคยเกิดขึ้นมาก่อน ซึ่งเป็นผลจากการนำกุ้งต่างถิ่นมาเลี้ยงในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม มีรายงานพบว่ากุ้งท้องถิ่นของประเทศไทย เช่น กุ้งก้ามกรามและกุ้งกุลาดำ ก็สามารถเป็นพาหะของโรคนี้อีกเช่นกันหากกุ้งมีสุขภาพอ่อนแอ (Senanan et al., 2007) และเมื่อปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยได้ประสบกับปัญหา กุ้งตายด่วน ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่ไม่ทราบสาเหตุว่าเกิดจากสิ่งใด มีการรายงานการแพร่ระบาดของกลุ่มอาการในทวีปเอเชียครั้งแรกที่ประเทศจีน เมื่อ ปี พ.ศ. 2552 ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ. 2553 ประเทศเวียดนามก็เผชิญปัญหากับกลุ่มอาการโรคตายด่วน เช่นเดียวกับประเทศจีน โดยมีการรายงานว่า กุ้งขาวแวนนาไมจะตายเป็นจำนวนมากภายในระยะเวลาสั้น ๆ เพียงแค่ 9 วัน จนถึง 30 วันหลังจากปล่อยลูกกุ้งขาวลงสู่บ่อดิน และไม่สามารถตรวจสอบหาสาเหตุการตายจำนวนมากของลูกกุ้งได้ว่าเกิดมาจากสาเหตุใด อีกทั้งยังไม่ทราบวิธีในการตรวจหาเชื้อโรคหรือปัจจัยใด ๆ ที่โน้มนำให้เกิดการตายจำนวนมากของลูกกุ้งได้ จึงเรียกตามลักษณะการเกิดของโรคนี้นี้ว่า โรคตายด่วน (early mortality syndrome, EMS) (Flegel, 2012) และในปี พ.ศ. 2555 ประเทศไทยได้พบวิกฤตการณ์การตายของลูกกุ้งขาวหลังจากปล่อยลงสู่บ่อดินเป็นจำนวนมาก ที่จังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด โดยมีลักษณะอาการตายด่วนเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นที่ประเทศจีนและเวียดนาม โดยไม่ทราบสาเหตุการเกิดโรคและวิธีในการตรวจหาเชื้อโรคหรือปัจจัยโน้มนำใด ๆ โดยปัจจุบันการรายงานถึงลักษณะกลุ่มอาการนี้ที่ใกล้เคียงกับวิธีการที่สามารถสังเกตได้จากภายนอกนั้นคือ กลุ่มอาการตับอ่อนเกิดเนื้อตายอย่างเฉียบพลัน (acute hepatopancreatic necrosis syndrome) (Tran et al., 2013) โดยดูจากลักษณะทางจุลพยาธิ

วิทยาของเนื้อเยื่อตับอ่อนที่เสียหาย และมีการลอกหลุดของผนังท่อตับอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับความผิดปกติของลักษณะตับอ่อนและทางเดินอาหารของลูกกุ้งเมื่อดูจากภายนอกแล้วพบว่า ตับอ่อนเปลี่ยนสีเป็นสีขาว หรือเหลือง ลำไส้และทางเดินอาหารว่าง ไม่มีอาหารอยู่ในหรือขาดช่วง เมื่อกดดูด้วยปลายนิ้วพบว่าตับอ่อนจะแข็งไม่แตกออก (Flegel, 2012) ทั้งนี้ยังพบลักษณะของเชื้อไมโครสปอริเดียที่เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้ง (จิรศักดิ์, 2555) ซึ่งภาวะกุ้งกุลาดำโตช้าผลตรวจทางอณูชีววิทยาในการตรวจหาสาเหตุของโรคพบว่า มีการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อไวรัส monodon baculovirus (MBV) และ hepatopancreatic parvo virus (HPV) เป็นสาเหตุ แล้วยังพบไมโครสปอริเดียภายในเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งที่ป่วยด้วย (Chayaburakul et al., 2004) จากภาวะการเกิดการตายโดยไม่ทราบสาเหตุของกุ้งในประเทศไทยนั้นพบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในเซลล์ตับและตับอ่อนร่วมด้วยทั้งภาวะกุ้งกุลาดำโตช้าและโรคตายด่วน ต่อมาพบว่าไมโครสปอริเดียชนิดนี้เป็นชนิดใหม่ที่พบในกุ้งกุลาดำ คือ *Enterocytozoon hepatopenaei* จากการศึกษาตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการโรคตายด่วนด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาพบว่า กุ้งที่ป่วยมีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิดนี้ร่วมด้วยการติดเชื้อชนิดนี้อาจเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดความรุนแรงและอัตราการตายของโรคนี้เพิ่มมากขึ้น (Tourtip et al., 2009) อีกทั้งยังพบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วยเป็นกลุ่มอาการขี้ขาว (white feces syndrome) หากมีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิดนี้ร่วมด้วยจะทำให้กุ้งมีอัตราการตายสูงขึ้น จะเห็นได้ว่าเมื่อกุ้งมีเชื้อไมโครสปอริเดียในร่างกายจะทำให้มีอัตราการตายสูงขึ้นเมื่อได้รับเชื้ออื่นแทรกซ้อน ดังนั้นการป้องกันไม่ให้กุ้งติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะสามารถลดความเสียหาย เมื่อเกิดโรคระบาดที่อาจเกิดขึ้นในการเลี้ยงกุ้งได้ (Tangprasittipap et al., 2013)

เชื้อไมโครสปอริเดียก่อโรคในกุ้งที่พบได้ในประเทศไทยมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ *Thelohania penaei* เชื้อชนิดนี้จะเข้าไปฝังตัวที่กล้ามเนื้อของกุ้ง โดยกุ้งขาวแวนนาไม กุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วยสามารถติดเชื้อนี้ได้ (Pasharawipas et al., 1994) ส่วนเชื้ออีกชนิดหนึ่ง คือ *E. hepatopenaei* ซึ่งค้นพบครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อ ปี พ.ศ. 2552 ในกุ้งกุลาดำ (Tourtip et al., 2009) และยังสามารถพบเชื้อชนิดนี้ได้ ทั้งในกุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งกุลาดำ ที่ป่วยเป็นกลุ่มอาการขี้ขาว (white feces syndrome) โดยโน้มนำให้กุ้งมีอัตราการตายสูงขึ้น (Tangprasittipap et al., 2013)

การตรวจหาเชื้อ *E. hepatopenaei* สามารถทำได้โดยการกดเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนกับกระจกสไลด์ (impression smear) แล้วย้อมสีจิมซาส่องดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ หรือเก็บเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา แต่การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์ เพื่อตรวจหารูปร่างและลักษณะของเชื้อออกจากเนื้อเยื่อปกติของตัวกุ้ง และหากมีการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ในปริมาณน้อย อาจทำให้แปลผลวินิจฉัยคลาดเคลื่อนได้ การตรวจทางอณูชีววิทยาเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจการติดเชื้อในปริมาณน้อยได้ อีกทั้งยังมีความแม่นยำและสามารถตรวจตัวอย่างกุ้งได้จำนวนมาก ๆ ในปัจจุบันพบการแพร่ระบาดของเชื้อ *E. hepatopenaei* ในฟาร์มกุ้งขาวแวนนาไมของประเทศไทยสูง แต่กุ้งอาจไม่แสดงอาการป่วยใด ๆ จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่ากุ้งสามารถได้รับเชื้อนี้จากการกินกุ้งที่ป่วยหรือมีเชื้อ โดยในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลว่าสัตว์ชนิดอื่นนอกจากกุ้งสามารถรับเชื้อชนิดนี้ได้ (Tangprasittipap et al., 2013) จากการศึกษาพบว่าเชื้อไมโครสปอริเดียหลายชนิดที่มีข้อมูลวงจรชีวิตและชนิดของสัตว์อื่น ๆ ที่สามารถติดเชื้อได้ครบถ้วน อย่างเช่น การศึกษาการติดเชื้อ *T. penaei* ในสัตว์ที่จับได้รอบ ๆ ฟาร์มกุ้งพบว่า ปลาตาหวาน

(*Priacanthus tayenus*) และปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) สามารถติดเชื้อ *T. penaei* เข้าไปในร่างกายได้ (Pasharawipas and Flegel, 1994) ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ โดยการเฝ้าระวังสัตว์ที่เป็นพาหะซึ่งอาจหลุดเข้ามาในบ่อเลี้ยงกุ้งได้ การตรวจหาเชื้อในสัตว์น้ำที่พบภายในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยวิธีการทางอนุชีววิทยา จะเป็นประโยชน์ในแง่การเฝ้าระวังโรค อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเข้าสู่กุ้งในฟาร์มได้ดียิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทำการตรวจหาชนิดของสัตว์น้ำขนาดใหญ่ (aquatic macrofauna) ที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งสามารถติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ได้

1.3 สมมติฐานในการวิจัย

สัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมสามารถติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ได้

1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

ทำการตรวจหาการติดเชื้อของสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยจับสัตว์น้ำที่อยู่ในบ่อหรืออยู่ในแหล่งน้ำบริเวณรอบฟาร์มกุ้ง ทำการตรวจการติดเชื้อโดยใช้วิธีทางอนุชีววิทยาที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* โดยติดตามการติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้งเริ่มเลี้ยง และวันสิ้นสุดการเลี้ยงในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งรวมถึงแหล่งน้ำบริเวณรอบฟาร์มกุ้ง เพื่อตรวจหาการติดเชื้อเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ในสัตว์น้ำชนิดอื่นนอกเหนือจากกุ้งขาวแวนนาไม เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเข้าสู่ฟาร์มกุ้ง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การวิจัยครั้งนี้จะทำให้ทราบชนิดของสัตว์น้ำขนาดใหญ่ชนิดอื่น ที่สามารถติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ได้ ซึ่งอาจเป็นสัตว์ที่สามารถแพร่เชื้อไปสู่กุ้งที่ไม่มีเชื้อ โดยสามารถใช้วิธีทางอนุชีววิทยา เฝ้าระวังการติดเชื้อของกุ้งและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่อยู่ในฟาร์ม และอาจเป็นแนวทางสำคัญในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อในกุ้งขาวแวนนาไมได้ตลอดการเพาะเลี้ยง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับกุ้งขาวแวนนาไม

Lee Boone ได้สำรวจพบกุ้งขาวแวนนาไมในปี ค.ศ. 1931 โดยให้ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* และมีชื่อสามัญที่องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) รับรองและใช้เรียกกันในระดับสากล คือ Pacific white shrimp โดยมีลำดับทางอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Class Crustacean

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Dendrobranchiata

Section Penacidea

Family Penaeidae

Genus *Penaeus Litopenaeus*

Species *vannamei* (Boone, 1931)

2.1.1 ลักษณะกุ้งขาวแวนนาไมและถิ่นที่อยู่อาศัย

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลที่มีแหล่งกำเนิดในทวีปอเมริกา บริเวณประเทศเม็กซิโกตอนเหนือ และแถบอเมริกาใต้จนถึงประเทศเปรู โดยมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างแพร่หลายในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่ประเทศเม็กซิโกจนถึงประเทศเปรู

กุ้งขาวแวนนาไม มีลำตัวสีขาวประกอบด้วย 7-10 ปล้อง ตัวผู้มีอวัยวะสืบพันธุ์ เรียกว่า petasma สำหรับปล่อยน้ำเชื้อ การสืบพันธุ์ของกุ้งขาวเป็นแบบกึ่งเปิด (semi-open) โดยตัวผู้จะสอดอวัยวะเพศเข้าสู่อวัยวะเพศของตัวเมียที่เรียกว่า thelycum โดยทั่วไปกุ้งขาวแวนนาไมจะมีลำตัวสีขาว แต่ลักษณะของสีลำตัวอาจเปลี่ยนไปได้จากอิทธิพลของอาหารและคุณภาพน้ำ เมื่อโตเต็มวัยจะมีความยาวประมาณ 23 เซนติเมตร โดยปกติเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ ตามธรรมชาติกุ้งที่โตเต็มวัยจะผสมพันธุ์ในทะเลเปิด และเมื่อลูกกุ้งอยู่ในระยะโพสต์ลาร์วา ก็จะว่ายน้ำเข้ามาเจริญเติบโตที่แนวชายฝั่งหรือป่าชายเลน เมื่ออายุได้ประมาณ 6-7 เดือน กุ้งจะเข้าสู่ระยะโตเต็มวัย กุ้งตัวผู้เมื่อโตเต็มวัยจะมีน้ำหนักถึง 20 กรัม และเพศเมียอาจหนักได้ถึง 28 กรัม การเลือกกุ้งเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์จะเลือกกุ้งที่มีขนาดใหญ่ น้ำหนักมากถึง 35-40 กรัม การวางไข่ครั้งหนึ่งจะได้จำนวนประมาณ 100,000-250,000 ฟอง โดยไข่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร (Briggs et al., 2004)

2.1.2 สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ในธรรมชาติทั้งระบบกึ่งหนาแน่นและระบบหนาแน่น ลักษณะพิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้ คือ สามารถปรับตัวให้เข้ากับระบบการเพาะเลี้ยงได้ง่ายเพราะสามารถเพาะเลี้ยงได้ในน้ำที่มีความเค็ม 0.5-45 ppt แต่ระดับความเค็มและอุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี คือ 10-15 ppt ที่ 23-30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Briggs et al., 2004) สำหรับวิธีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแบบธรรมชาติ (extensive) คือ ปล่อยลูกกุ้งจำนวนน้อย และแบบพัฒนา (intensive) ที่มีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่น ในการเลี้ยงกุ้งจะทำการเลี้ยง 2-3 รอบต่อปี โดยปล่อยลูกกุ้งในระยะโพสต์ลาร์วา และเลี้ยงในบ่อจนกุ้งได้ขนาดใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 67-164 วัน จึงสามารถจับขายได้ (Aquacops, 1984)

2.2 โรคติดเชื้อที่พบในกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทย

การส่งออกกุ้งทะเลเป็นอุตสาหกรรมที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศไทยได้เป็นอย่างมาก ในอดีตประเทศไทยเคยเป็นประเทศที่มีกำลังการส่งออกกุ้งกุลาดำเป็นสินค้าให้กับตลาดโลกได้เป็นอันดับต้น ๆ จนเมื่อเกิดการระบาดของโรคไวรัส เช่น กลุ่มอาการโรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus: WSSV) และ โรคหัวเหลือง (Yellow Head Virus: YHV) เมื่อปี ค.ศ. 1990 เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจึงแก้ปัญหาโดยการเลี้ยงกุ้งในความเค็มต่ำ เพื่อชะลอความรุนแรงของโรค ทำให้เกิดปัญหากุ้งกุลาดำโตช้าและขายไม่ได้ราคา จึงเริ่มมีการนำกุ้งขาวแวนนาไมจากต่างประเทศเข้ามาเลี้ยงในปี ค.ศ. 1998 (Senanan et al., 2007) ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดี อย่างไรก็ตาม ในปี ค.ศ. 2002 มีการตรวจพบกลุ่มอาการโรคทอรา (Taura Syndrome Virus: TSV) ในกุ้งขาวแวนนาไม การแพร่กระจายของกลุ่มอาการทอรานี้พบระบาดเป็นครั้งแรกในประเทศเอกวาดอร์ และแพร่เข้าสู่ทวีปเอเชีย เนื่องจากการนำเข้าพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วยจากทวีปอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1996 (Briggs et al., 2004) ต่อมาแพร่เข้าสู่ประเทศจีนในปี ค.ศ. 1999 และระบาดเข้าสู่ประเทศไทยในปี ค.ศ. 2002 ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อไวรัสเหล่านี้ยังสามารถตรวจพบได้ในกุ้งพื้นเมืองของไทย เช่น กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) และ กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) โดยที่กุ้งจะไม่แสดงอาการป่วยแต่อย่างใด (Nielsen et al., 2005) จากอุบัติการณ์ของโรคระบาดที่เกิดขึ้นในประเทศไทยพบว่า เมื่อพบการระบาดของโรคในประเทศที่มีการเลี้ยงกุ้งของทวีปเอเชีย โอกาสการเกิดการระบาดในประเทศไทยจะมีความเป็นไปได้สูง เนื่องจากการพัฒนาของกระแสลม รวมถึงการเลี้ยงกุ้งโดยใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อโรคเข้าสู่ฟาร์มกุ้งได้ จากรายงานที่พบว่า กุ้งพื้นเมืองของไทยสามารถรับเชื้อได้ แต่ไม่แสดงอาการ (Senanan et al., 2007) แสดงให้เห็นว่าสัตว์แต่ละชนิดมีภูมิต้านทานต่อเชื้อโรคที่แตกต่างกัน ทำให้การควบคุมและกำจัดโรคทำได้ลำบาก เนื่องจากในฟาร์มกุ้งจะพบสัตว์ชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากกุ้งซึ่งสามารถติดเชื้อและนำเชื้อเข้าสู่ฟาร์มกุ้งได้

2.2.1 เชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสที่สามารถพบในกุ้งมีกว่า 20 ชนิด โดยความรุนแรงที่เกิดขึ้นกับกุ้งจะมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิด และสภาพแวดล้อมที่เลี้ยงกุ้ง ในประเทศไทยโรคตัวแดงดวงขาวจากเชื้อ WSSV เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดความเสียหายมากที่สุด มีอัตราการตายสูงและใช้เวลาไม่นาน โรคหัวเหลืองจาก

เชื้อ YHV เป็นโรคที่ทำให้กุ้งตายได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน และก่อให้เกิดความเสียหายได้ทั้งในกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวแวนนาไม ส่วนโรคกล้ามเนื้อขาว (Infectious Myonecrosis Virus: IMNV) และโรคทอรา ก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแวนนาไม แต่ส่งผลกระทบต่อกุ้งกุลาดำน้อยกว่ากุ้งขาวแวนนาไม (Lightner, 1985)

2.2.2 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งโดยมากจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มหลัก คือ *Vibrio* spp. ชนิดที่พบบ่อย คือ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* และ *V. anguillarum* โดยอาจพบแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. และ *Aeromonas* sp. ร่วมด้วย ซึ่งจะทำให้กุ้งสุขภาพอ่อนแอ แม้จะมีรายงานว่า แบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์น้ำ (normal flora) แต่หากมีปริมาณมากหรือก่อให้เกิดความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงเร็วเกินไปจนกุ้งปรับตัวไม่ทัน (Sung et al., 2001) จะทำให้กลไกในการกำจัดแบคทีเรียออกจากร่างกายกุ้งเสื่อมประสิทธิภาพ ส่งผลให้กุ้งป่วยได้ (Lightner, 1985)

2.2.3 เชื้อรา

เชื้อราในกุ้งสามารถพบได้ในระบบการเลี้ยงที่ไม่สะอาด มีรายงานการติดเชื้อราในกลุ่ม *Lagenidium* sp. และ *Sirolopidium* sp. ในกุ้งพ่อแม่พันธุ์ของกุ้งขาวจีน (*Penaeus orientalis*) ในทะเลเหลืองของประเทศจีน ทำให้ออกไข่ลดลง ส่วนเชื้อราในกลุ่ม *Fusarium* sp. กลับส่งผลกระทบต่อในบ่อเลี้ยงลูกกุ้งมากกว่า *Lagenidium* sp. และ *Sirolopidium* sp. การติดเชื้อ *Fusarium* sp. ในปริมาณมากอาจพบสายรา (hyphae) ตามร่างกาย ขัดขวางการดำรงชีวิตของกุ้ง ส่งผลให้กุ้งสุขภาพอ่อนแอและติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนได้ง่าย (Lightner, 1985)

2.2.4 เชื้อโปรโตซัว

โปรโตซัว คือ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมีเซลล์เดียว โปรโตซัว เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความเชื่อมโยงกับมนุษย์และสัตว์ โดยก่อให้เกิดโรคหลายชนิด จึงทำให้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยการศึกษาส่วนใหญ่ให้ความสำคัญและมุ่งเน้นไปที่การหาวิธีป้องกันและกำจัดโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ความแตกต่างของรูปร่างโปรโตซัวแต่ละชนิดสามารถอธิบายได้จากลักษณะพื้นฐานทั่วไป เซลล์อาจมีรูปร่างเป็นทรงกลม ทรงแบนบาง เรียวยาว หรือรูปร่างที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา ขนาดของโปรโตซัวมีความหลากหลายตั้งแต่ขนาดเล็กไปจนถึงขนาดใหญ่ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ปัจจัยที่มีผลต่อขนาดและรูปร่างของโปรโตซัว คือ อาหาร และ จำนวนประชากร

มีการรายงานถึงโปรโตซัวหลายชนิดที่เป็นปรสิตในกุ้ง เช่น โรค protozoa fouling มีสาเหตุเกิดจากโปรโตซัวในกลุ่ม ciliate หลายสกุล ได้แก่ *Acineta*, *Acophrys*, Bodo-like flagellate, *Chrysidella*, *Cothurnia*, *Ephelota*, *Epistylis*, *Lagenophry*, *Vorticella* และ *Zoothamnium* โดยโปรโตซัวเหล่านี้จะเกาะตามส่วนต่าง ๆ เช่น เหงือก ไรยางค์ และตามผิวหนังตัว ทำให้กุ้งเกิดความรำคาญ และความเครียดตามมา โดยถ้ามีโปรโตซัวจำนวนมากอยู่ตามร่างกายในระยะลอกคราบ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้กุ้งตายได้ จากการที่โปรโตซัวเหล่านั้นเข้ามาขัดขวางการแลกเปลี่ยนออกซิเจนที่

เห็บและขั้วขวางการลอกคราบ หากมีอาการรุนแรงจะพบการเกาะกลุ่มที่มีลักษณะเหมือนขนตามลำตัวของกิ้ง (Lightner, 1996) นอกจากนี้ยังพบว่ามียุงโปรโตซัว Gregarine อาศัยอยู่บริเวณทางเดินอาหารของกิ้ง ได้แก่ *Nematopsis* sp. และ *Cephalolobus* sp. (Lightner, 1993) ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการแลกเปลี่ยนของกิ้งในระยะวัยรุ่นไม่ดี สังเกตได้จากส่วนทางเดินอาหารจะมีสีเหลืองหรือสีที่จางลงกว่าปกติ (Lightner, 1996) ในหลายประเทศพบรายงานการเกิดโรคในกิ้งหลายชนิดจากปรสิตกลุ่มไมโครสปอริเดีย โดยส่วนใหญ่ลักษณะของกิ้งที่ติดเชื้อจะพบเป็นก้อนเนื้อสีขาวขุ่นในส่วนต่าง ๆ ของกิ้ง และเมื่อนำก้อนเนื้อสีขาวขุ่นมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบลักษณะของปรสิตขนาดเล็กจำนวนมาก

2.3 การติดเชื้อไมโครสปอริเดีย

ไมโครสปอริเดีย เป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยใน Class Arthropoda อีกทั้งยังพบเป็นปรสิตในหนอนตัวแบน (flatworm) หนอนตัวกลม (nematode) หนอนปล้อง (annelid) และหนอนจักร (rotifera) รวมไปถึงสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปลา สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก แต่พบน้อยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไมโครสปอริเดียจัดอยู่ในไฟลัม Microspora ตามลักษณะสัณฐานวิทยาและจัดอยู่ในกลุ่มโปรโตซัว เนื่องจากมีลักษณะบางประการที่คล้ายกับ eukaryotic cell ได้แก่ การมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีไซโตพลาสซึมแต่ยังมีลักษณะบางประการที่เป็นลักษณะของ prokaryote cell เช่น การไม่มีไมโทคอนเดรีย และ peroxisome จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่ามีความใกล้ชิดกับรา (นิมิตร มรกต และ เกตุรัตน์ สุขวัจน์, 2539) เชื้อไมโครสปอริเดียมีความหลายหลากทางชนิดมากถึง 1,200 ชนิดและถูกค้นพบมานานมากกว่า 100 ปี โดยชนิดแรกที่พบคือ *Nosema bombycis* ซึ่งเป็นปรสิตของหนอนไหม (*Bombyx bori*) เชื้อไมโครสปอริเดียสามารถพบเป็นปรสิตกับสัตว์ได้แทบทุกชนิด ส่วนมากมักเป็นปรสิตในทางเดินอาหาร และยังสามารถพบที่ตำแหน่งอื่น ๆ ของร่างกายโฮสต์ได้ (Ghosh and Weiss, 2009) โดยไมโครสปอริเดียที่พบมีรายงานการติดในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ *Agmasoma*, *Ameson*, *Enterospora*, *Flabelliforma*, *Glugoides*, *Nosema*, *Ordospora*, *Nadelspora*, *Pleistophora*, *Thelohania*, *Tuzetia* และ *Vavraia* (Tourtip et al., 2009)

ไมโครสปอริเดียจัดเป็นปรสิตที่ต้องอาศัยการเจริญเติบโตภายในเซลล์ (obligate intracellular parasite) สปอร์มีรูปร่างกลมรี ขนาด 0.7-1.1 ไมโครเมตร ภายในสปอร์มีโครงสร้างพิเศษที่เป็นท่อขดเป็นเกลียววนติดกับผนังสปอร์ด้านใน เรียกว่า polar tube หรือ polar filament ซึ่งสร้างมาจาก golgi apparatus พิเศษที่เรียกว่า posterosome จำนวนรอบเกลียวใช้เป็นลักษณะวินิจฉัยแยกชนิดของไมโครสปอริเดียได้ ในขณะที่สปอร์อยู่นอกร่างกายสิ่งมีชีวิต ผนังสปอร์เป็นเยื่อสองชั้น ชั้นนอก (exospore) เป็น chitin และชั้นใน (endospore) ที่มีความหนากว่าโดยด้านหน้ามี polar cap ผนังที่อยู่ถัดลงไปคือ polar sac หรือ polaroplast มีความเกี่ยวข้องกับการยื่นออกของ polar filament จะไม่มีการใช้พลังงานจากตัวเอง เพราะไม่มีไมโทคอนเดรียสปอร์มีรูปร่างกลม แต่ละสปอร์จะมี 1 สปอโรพลาสซึม (sporoplasm) และ polar filament เป็นท่อยาวยื่นออกมาจากสปอร์ ไมโครสปอริเดียเข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตโดยการใช้ท่อ polar filament เจาะทะลุเข้าสู่เซลล์ จากนั้นสปอโรพลาสซึมจะถูกดันผ่านท่อเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์สิ่งมีชีวิต ต่อมาสปอโรพลาสซึม

จะเพิ่มจำนวนเป็นระยะ plasmodium หลายนิวเคลียส ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้ในโฮสต์เดิม การพัฒนาไปเป็นสปอร์ผ่านกระบวนการ sporogony โดยเริ่มจากผิวนอกของเซลล์จะทึบดำเล็กน้อยมากขึ้น แต่ละนิวเคลียสเจริญเป็น 1 sporont เรียกระยะนี้ว่า สปอรอนต์ (sporont) ซึ่งแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ และเกิดมีออร์แกเนลล์ขึ้นในเซลล์เรียกระยะนี้ว่า สปอโรบลาสต์ (sporoblast) ซึ่งจะเจริญต่อไปเป็นสปอร์ (นิมิตร มรกต และ เกตุรัตน์ สุขวัจน์, 2539) สปอร์ของเชื้อมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกร่างกายได้ โดยสามารถมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้เป็นระยะเวลาหลายปี (Garcia, 2002) การแพร่กระจายของเชื้อจึงเกิดขึ้นได้หลายวิธี เช่น ปนเปื้อนมากับอาหาร หรือผ่านทางกรหายใจ (Weiss, 2001)

การติดเชื้อของปรสิตในกลุ่มไมโครสปอริเดีย แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การติดเชื้อทางแนวนราบ (horizontal transmission) และการติดเชื้อทางแนวตั้ง (vertical transmission) การติดเชื้อทางแนวนราบจะเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดเชื้อจากโฮสต์สู่โฮสต์ ซึ่งเชื้ออาจอยู่ในระยะเดิม หรือพัฒนาเป็นอีกระยะได้ การติดเชื้อทางแนวนราบสามารถติดได้ผ่านการกิน การสืบทพันธุ์ หรือการสัมผัส โดยเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายโฮสต์โดยตรงผ่านทางผนังเยื่อ (epithelium) โดยสปอร์จะเจาะเข้าไปยังผนังทางเดินอาหารของโฮสต์และแทรกตัวไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกายโฮสต์ได้ การติดเชื้อไมโครสปอริเดียผ่านระบบสืบทพันธุ์เพศเมียยังพบน้อยในสัตว์กลุ่มอื่น แต่ในสัตว์กลุ่มอาร์โทพอด (arthropod) พบการติดเชื้อในระบบสืบทพันธุ์เพศเมียร่วมกับติดเชื้อทางแนวนราบ การติดเชื้อทางแนวตั้งจะเป็นการถ่ายทอดเชื้อจากรุ่นสู่รุ่น (generation) การติดเชื้อทางแนวตั้งสามารถพบได้ในเชื้อโรคหลายชนิดทั้งไวรัส แบคทีเรีย โปรโตซัว และพยาธิ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถติดเชื้อผ่านทางแนวตั้งได้โดยการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูกผ่านทางรก หรือผ่านทางน้ำนม การติดเชื้อทางระบบสืบทพันธุ์เพศเมีย (transovarial transmission) เป็นการถ่ายทอดเชื้อที่พบบ่อยในกลุ่มปรสิตชนิดอาศัยในเซลล์ (intracellular parasite) ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ไวรัส แบคทีเรีย และโปรโตซัว ปรสิตจะอยู่ที่ไซโทพลาสซึมของไข่ (ova) ที่ระบบสืบทพันธุ์และติดต่อผ่านการสร้างตัวอ่อนรุ่นถัดไป (cytoplasmic inheritance) ตัวอย่างการติดเชื้อประเภทนี้ เช่น การติดเชื้อทางระบบสืบทพันธุ์เพศเมียของ Ross River Virus ที่ติดยุง *Aedes vigilax* (Vale et al., 1992) การติดเชื้อแบคทีเรียในแมลงและสัตว์กลุ่มครัสตาเซีย (crustacean) (Werren and O'Neill, 1997) และการติดเชื้อ haplosporidian-like ในสัตว์กลุ่มครัสตาเซีย (Dunn et al., 1995)

2.3.1 การแพร่กระจายตัวของเชื้อ

ไมโครสปอริเดียเป็นเชื้อที่สามารถติดต่อสู่สัตว์ได้หลายชนิดตั้งแต่โปรโตซัวจนถึงมนุษย์ แต่ครั้งหนึ่งพบติดในแมลง โดยไมโครสปอริเดียชนิดแรกที่พบ คือ *Nosema bombycis* ที่เกิดในหนอนไหม (*Bombyx mori*) ซึ่งพบเป็นการติดเชื้อทางแนวนราบจากการที่หนอนกินสปอร์ของเชื้อเข้าไป และยังพบการติดเชื้อผ่านทางระบบสืบทพันธุ์เพศเมียร่วมด้วย ในแมลงนอกจากการระบบติดเชื้อผ่านการกินสปอร์เข้าไปแล้วยังพบการติดเชื้อผ่านทางระบบสืบทพันธุ์เพศเมียในช่วงหนึ่งของวงชีวิตร่วมด้วย (Andreadis, 1985)

ไมโครสปอริเดียเป็นสาเหตุให้เกิดโรคในปลาได้ (Lom et al., 1995) โรคที่เกิดขึ้นจะมีวิธีการที่แตกต่างกัน ไมโครสปอริเดียชนิด *Glugea* sp. และ *Loma* sp. จะรวมตัวกันเป็นก้อนไมโครสปอ

ริเดียที่เรียกว่า xenoma โครงสร้างจะมีเป็นก้อนขนาดใหญ่ ภายในก้อน xenoma จะมีเชื้อจำนวนมากรวมกลุ่มกันอยู่ สามารถแย่งแหล่งพลังงานจากโฮสต์ได้ (Canning and Lom, 1986) เมื่อก้อน xenoma ขยายตัวจนมีขนาดใหญ่ ก้อนเชื้อจะแตกและปล่อยสปอร์ของเชื้อออกมาเป็นจำนวนมาก และก้อน enoma จะเจริญกลายเป็นก้อนเนื้อ granuloma ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อของโฮสต์ได้ ไมโครสปอริเดียชนิดอื่น เช่น *Pleistophora* sp. จะไม่ทำให้เกิดก้อนเนื้อ แต่เชื้อจะเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อในอวัยวะอื่น ๆ (Pulsford and Matthews, 1991) โดย *Pleistophora* สามารถพบได้ในเซลล์ไข่ (oocyte) ของปลา แต่ยังไม่อาจสรุปได้ว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านระบบสืบพันธุ์เพศเมียได้หรือไม่ โดยไมโครสปอริเดียของเชื้อชนิดนี้จะไปติดและทำลายเนื้อเยื่อของเซลล์ไข่เท่านั้น

การติดเชื้อไมโครสปอริเดียในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น เชื้อสกุล *Encephalitozoon* สามารถเข้าได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด โดยไมโครสปอริเดียจะเข้าไปยังอวัยวะของร่างกาย เช่น สมองและไต ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออวัยวะเหล่านั้น ทั้งนี้ *Encephalitozoon* ยังเป็นเชื้อที่ติดจากสัตว์มาสู่มนุษย์ (zoonosis) ได้อีกด้วย โดยมนุษย์จะได้รับเชื้อผ่านทางกรกินสปอร์เข้าสู่ร่างกาย อีกทั้งยังพบว่าสามารถติดเชื้อผ่านทางรกได้ เชื้อ *Encephalitozoon* นี้ พบได้มากในผู้ติดเชื้อ HIV (human immunosuppressed virus: HIV) ซึ่งเชื้อไมโครสปอริเดียมักพบจะเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic) ที่จะเพิ่มจำนวนในร่างกายของโฮสต์อย่างรวดเร็วเมื่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายลดต่ำลง

2.3.2 การเคลื่อนที่ของปรสิตตามระยะการพัฒนาร่างกายของโฮสต์ (localization of the parasite during host development)

การติดเชื้อผ่านทางระบบสืบพันธุ์เพศเมียจะเกิดขึ้นในระยะไซโกต (zygote) ของโฮสต์ ไมโครสปอริเดียจะเข้ามายังระบบสืบพันธุ์ของโฮสต์ โดยวิธีแทรกตัวเข้ามายังเซลล์ระบบสืบพันธุ์มี 2 รูปแบบ คือ รูปแบบที่หนึ่ง ไมโครสปอริเดียจะติดอยู่ในเซลล์ไข่ (yolk) และระยะตัวอ่อน (embryo) โดยที่เชื้อจะไม่ขัดขวางกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์สืบพันธุ์ของโฮสต์ เช่น การติดเชื้อ *Nosema* ผ่านทางเซลล์ไข่ของหนอน Eastern tent caterpillar (*Malacosoma americanum*) ซึ่งอยู่ติดกับส่วนทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) เชื้อไมโครสปอริเดียจะแทรกตัวผ่านเข้ามาสู่เซลล์ไข่ได้ หรือการติดเชื้อ *Nosema locustae* ในช่วง embryogenesis ในตัวอ่อนของตั๊กแตน African migratory locust (*Locusta migratoria migratorioides*) จะเริ่มสร้างสปอร์เมื่อมีการพัฒนาของตัวอ่อน พบเพียงระยะเมอรอนท์ (meront) ในเนื้อเยื่อตัวอ่อนสำหรับรูปแบบที่สอง ไมโครสปอริเดียจะติดอยู่ในเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่เนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ และจะเข้ามาติดเชื้อในโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่แล้ว ตัวอย่างเช่น การติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *Nosema granulosis* ซึ่งจะติดอยู่กับโฮสต์บริเวณ sub-epidermal cell ของตัวอ่อนแอมปิพอด (amphipod) *Gammarus duebeni* และจะแทรกตัวเข้าสู่เซลล์ฟอลลิเคิล (follicle cell) เมื่อมีการแบ่งตัวที่โอโอไซต์ (Terry et al., 1997)

2.3.3 กลไกการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์โฮสต์ (mechanisms of parasite migration within the host)

กลไกการเคลื่อนตัวของเชื้อไมโครสปอริเดียเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์มี 3 วิธี ได้แก่

- 1) สปอร์เข้าไปติดในระยะ germination สปอร์ของเชื้อไมโครสปอริเดียจะเจาะเข้าสู่เซลล์โฮสต์แล้วถ่าย สปอโรพลาสซึม (sporoplasm) เข้าสู่โฮสต์ หรือสปอร์ของเชื้อไมโครสปอริเดียบางชนิดสามารถเข้าสู่เซลล์ของโฮสต์ได้ทันทีผ่านเซลล์ที่อยู่ติดกัน (auto infection) เช่น ไมโครสปอริเดียชนิด *Nosema granulosis*
- 2) การติดเชื้อเข้าสู่เซลล์เคลื่อนที่ของโฮสต์ (infection of mobile host cell) เช่น ในยุง จะมี oenocyte ซึ่งจะเคลื่อนตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อรังไข่ (ovarian tissue) เมื่อมีการพัฒนาของโอโอไซต์เกิดขึ้น เชื้อไมโครสปอริเดียนี้จะฉวยโอกาสติดเชื้อเข้าสู่เนื้อเยื่อของรังไข่โดยฝังตัวไว้กับ oenocyte ของเซลล์โฮสต์
- 3) การติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ลูก (daughter cell) เกิดเมื่อเซลล์ของโฮสต์ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย เกิดการแบ่งตัวเป็น 2 เซลล์ หรือ ที่เรียกว่าเซลล์ลูก โดยเชื้อไมโครสปอริเดียจะแบ่งตัวออกไปอยู่ในเซลล์ใดเซลล์หนึ่งของเซลล์ลูกหรืออาจจะอยู่ในเซลล์ลูกที่เกิดใหม่ทั้ง 2 เซลล์เลยก็ได้

2.3.4 วิธีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย

- 1) การติดเชื้อโดยการสัมผัส (direct contact) ซึ่งเป็นการแพร่เชื้อทางแนวราบ (horizontal transmission) เป็นวิธีหลักที่ไมโครสปอริเดียจะติดเชื้อจากโฮสต์หนึ่งสู่อีกโฮสต์หนึ่ง โดยจะพบมากในไมโครสปอริเดียที่พบการติดเชื้อในโฮสต์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เมื่อโฮสต์ได้รับเชื้อไมโครสปอริเดียเข้าไปในร่างกายจะเพิ่มจำนวนและแย่งอาหารจากโฮสต์ โดยจะพบสปอร์ของไมโครสปอริเดียถูกปล่อยออกมาทั้งกับสิ่งขับถ่ายของตัวโฮสต์ที่ติดเชื้อ หรือ สารคัดหลั่ง (secretory product) หรือออกจากร่างกายโฮสต์ที่ตาย การติดเชื้อผ่านการกิน โดยจะพบว่าไมโครสปอริเดียจะเริ่มแทรกตัวเข้าสู่เซลล์โฮสต์ที่ตำแหน่งทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) จะพบการแพร่เชื้อทางแนวราบมากหากโฮสต์ที่ติดเชื้อเป็นสัตว์ที่กินกันเอง (carnivores)
- 2) การแพร่ผ่านระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (transovarial transmission) ซึ่งเป็นการแพร่เชื้อแนวตั้ง (vertical transmission) มีไมโครสปอริเดียเพียงไม่กี่ชนิดที่มีการติดเชื้อผ่านทางวิธีนี้ คือ *Nosema empoascae* ที่ติดในตั๊กแตน potato leaf hopper (*Empoasca fabae*) ซึ่งสามารถติดผ่านทางแนวราบจากการกินซากได้อีกด้วย และ *N. granulosis* ในแอมป์พอด *Gammarus duebeni* และ *N. locustae* ในตัวอ่อน (embryo) ของตั๊กแตน African migratory locust (*Locusta migratoria migratorioides*)
- 3) การแพร่ร่วมกันหลายทาง (mixed transmission strategies) ไมโครสปอริเดียที่สามารถแพร่ได้ทั้งแนวราบและติดผ่านระบบสืบพันธุ์เพศเมียด้วยทั้ง 2 วิธี จะเกิดขึ้นเมื่อโฮสต์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ไมโครสปอริเดียยังคงอยู่แม้จะไม่ใช้โฮสต์เดิม เช่น การติดเชื้อไมโครสปอริเดีย *Amblyospora* ในยุง *Aedes* sp.

ที่ไข่ของยุงตลอดฤดูหนาว (Andreadis, 1985) หรือการติดเชื้อในโฮสต์อื่นร่วมกัน (alternated host) เช่น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นยุงรำคาญชนิด *Culex dolosus* จะตายลงทำให้เชื้อ *Amblyospora dolosi* ย้ายตัวเองไปติดเชื้อในโฮสต์ใหม่ คือ โคพีพอด (copepod) จนเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นก็จะกลับมาติดกับยุงใหม่อีกครั้ง (Micieli et al., 1998) หรือในเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *Edhazardia aedis* ในยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) พบว่า เมื่อโฮสต์ คือ ยุงมีสภาพร่างกายที่สมบูรณ์ เช่น ปริมาณไขมันในร่างกายมีมาก เชื้อ *E. aedis* จะมีการแบ่งตัวทั้งในแนวราบและผ่านระบบสืบพันธุ์เพศเมีย แต่เมื่อโฮสต์อยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสม เชื้อ *E. aedis* จะเปลี่ยนลักษณะการติดเชื้อเหลือแต่เพียงการติดเชื้อในแนวราบเท่านั้น (Koella et al., 1998)

2.4 การติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกุ้ง

ไมโครสปอริเดียเป็นปรสิตของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด โดยก่อให้เกิดโรคในกุ้งที่เลี้ยงตามธรรมชาติและกุ้งที่เลี้ยงในบ่อทั้งในระยะวัยอ่อนและกุ้งที่โตเต็มวัย ซึ่งพบว่าปรสิตจะเข้าไปแทรกอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของกุ้ง เกิดอาการที่มีลักษณะผิดปกติ เช่น กล้ามเนื้อจะมีสีขาวแทรกในบริเวณที่มีการติดเชื้อ เรียกชื่อโรคนี้ว่า milky shrimp หรือ cotton shrimp (Iversen and Manning, 1959)

ไมโครสปอริเดียที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งมี 5 สกุล คือ *Nosema*, *Pleistophora*, *Inodosporus*, *Thelohania* และ *Enterocytozoon* ในแต่ละสกุลจะพบการติดเชื้อของกุ้ง ดังนี้

Nosema รายงานการพบไมโครสปอริเดียชนิด *Nosema nelsonii* ในกุ้ง brown shrimp (*P. azteus*) และกุ้ง white shrimp (*P. setiferus*) ในแม่น้ำ Mississippi โดย *N. nelsonii* จะเข้าไปแทรกอยู่ที่บริเวณหางกุ้ง ทำให้เกิดเป็นลักษณะสีขาว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของปรสิตชนิดนี้ โดยสปอร์ของ *N. nelsonii* เป็นสปอร์เดี่ยวที่ไม่มีถุงหุ้ม มีความยาว 25 ไมโครเมตร และกว้าง 1.5 ไมโครเมตร

Pleistophora sp. (Baxter et al., 1970) พบรายงานการติดเชื้อในกุ้ง brown shrimp และ white shrimp ในรัฐ Texas, Louisiana และ Mississippi โดยปรสิตสกุลนี้จะแทรกอยู่ตามกล้ามเนื้อ หัวใจ ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เหนือก และกระเพาะอาหาร โดยสปอร์ของ *Pleistophora* จะมีลักษณะคล้ายลูกแพร์ (pyriform) มีความยาว 2.3-3.0 ไมโครเมตร กว้าง 1.7-2.5 ไมโครเมตร โดยแต่ละสปอร์จะรวมกันเป็นกลุ่มอยู่ในถุงสปอร์ ซึ่งจะมีขนาดตั้งแต่ 11-50 ไมโครเมตร และแต่ละถุงสปอร์จะมีสปอร์เดี่ยว 14-130 สปอร์ (Overstreet, 1973) ไมโครสปอริเดียอีกสกุลหนึ่งที่พบบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแอตแลนติกในประเทศฝรั่งเศส และโปรตุเกส โดยกุ้งที่ติดเชื้อจะแสดงอาการกล้ามเนื้อเป็นสีขาว ชุ่มให้เห็นได้อย่างชัดเจน

Inodosporus octospora เชื้อชนิดนี้สปอร์เดี่ยวมีลักษณะเป็นวงรี (ellipsoidal) ยาว 2.0-2.7 ไมโครเมตร และ กว้าง 1.0-1.5 ไมโครเมตร โดยสปอร์เดี่ยว 8 สปอร์จะรวมกลุ่มอยู่ในถุงหุ้มสปอร์ (sporophorous vesicle) (Azevedo et al., 2000)

Thelohania เป็นไมโครสปอริเดียมที่มีรายงานการติดเชื้อในกุ้ง เชื้อ *Thelohania penaei* พบในกุ้ง (*P. setiferus*) white shrimp โดยจะแทรกตัวอยู่ในบริเวณลำตัวของกุ้ง ในกล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลายและเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ สามารถเห็นการติดเชื้อบริเวณใต้เปลือกส่วนหัว (Sprague, 1950) สปอร์มีลักษณะคล้ายลูกแพร์ 8 สปอร์ โดยสปอร์จะรวมกลุ่มอยู่ใน 1 ถุงหุ้มสปอร์ขนาด 7-12 ไมโครเมตร แต่ละสปอร์มีความยาว 2.5-4.7 ไมโครเมตร และกว้าง 2.0-3.5 ไมโครเมตร สำหรับ *T. duorata* และกุ้ง pink shrimp (*P. duorarum*) (Iversen and Manning, 1959) มีรายงานการติดเชื้อในกุ้ง Caribbean brown shrimp (*P. brasiliensis latreille*) (Iversen and Van Meter, 1964) ซึ่งลักษณะของกุ้ง ที่ติดเชื้อปรสิตนี้จะพบสปอร์แทรกอยู่ในเส้นใยของกล้ามเนื้อ หรือบางครั้งอาจจะเข้าไปแทนที่เนื้อเยื่อนั้นอย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังอาจพบที่บริเวณหัวใจ อวัยวะสืบพันธุ์ สมอ และอวัยวะอื่น ๆ โดยสปอร์มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ ยาว 4.7-6.8 ไมโครเมตร กว้าง 3.4-4.2 ไมโครเมตร ถุงหุ้มสปอร์มีขนาด 8.5-13.6 ไมโครเมตร โดยแต่ละถุงหุ้มมีสปอร์เต็มอยู่ 8 สปอร์ (Overstreet, 1973) นอกจากนี้ชนิดของ *Thelohania* ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมี *Thelohania* ชนิดอื่น ๆ ที่เป็นปรสิตในกุ้งและครัสตาเซียนชนิดอื่นอีกด้วย

ในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อ ไมโครสปอริเดียม 2 ชนิดในกุ้ง คือ *Thelohania penaei* ที่พบในกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้ง โดยเชื้อจะเข้าไปเพิ่มจำนวนจนแน่นทั่วกล้ามเนื้อบริเวณหน้าท้องและโคนหาง เกิดเป็นวิการที่มีกล้ามเนื้อขาวขุ่นเกิดขึ้น (cotton tail disease) โดยเชื้อนี้สามารถติดได้ในกุ้ง 2 ชนิด คือ กุ้งแชบ๊วย (*P. merguensis*) และกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) แสดงให้เห็นว่าในกุ้งต่างชนิดกันยังสามารถได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายได้ จากการสำรวจการติดเชื้อในสัตว์อื่น ๆ ที่อยู่รอบฟาร์มกุ้งในจังหวัดสงขลาที่ติดเชื้อ *T. penaei* โดยทำการศึกษาดังแต่เดือน มิถุนายน จนถึงเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2537 โดยสังเกตจากวิการของกุ้งที่มีกล้ามเนื้อขาวขุ่นกลางหลัง และทำการตรวจยืนยันวิการของโรคว่าเกิดจากเชื้อ *T. penaei* ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ ร่วมกับการเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่พบในบ่อกุ้งที่มีการติดเชื้อ จากตัวอย่างสัตว์ 22 ชนิด พบว่า มี 2 ชนิดที่ให้ผลบวกกับเชื้อ *T. penaei* คือ ปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) และปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) (Pasharawipas and Flegel, 1994)

Enterocytozoon hepatopenaei ปัจจุบันพบการติดเชื้อชนิดนี้ที่ผนังท่อของตับและตับอ่อนในกุ้งกุลาดำ เชื้อชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ Enterocytozoonidae จากการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอพบว่าลักษณะลำดับสายนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ของเชื้อไมโครสปอริเดียมที่พบในเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ จากการเทียบลำดับสายนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความคล้ายกับเชื้อไมโครสปอริเดียมวงศ์ Enterocytozoonidae ซึ่งมีความแตกต่างจาก ไมโครสปอริเดียมชนิด *Nucleospora* และ *Enterospora* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับชนิด *Enterocytozoon* แต่มีความแตกต่างกับเชื้อ *Enterocytozoon bieneusi* ที่สามารถติดเชื้อได้ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง จึงจัดให้ไมโครสปอริเดียมชนิดนี้เป็นชนิดใหม่ที่พบเฉพาะในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ไมโครสปอริเดียมในกลุ่ม Enterocytozoonidae ที่สามารถติดเชื้อได้ในสัตว์น้ำ ได้แก่ *Enterospora canceri* ที่พบการติดเชื้อ ในปู hermit crab (*Eupagus bernhardus*) ซึ่งมีลักษณะการติดเชื้อที่แตกต่างกับ *E. hepatopenaei* คือ *Enterospora canceri* จะเข้าไปแบ่งตัวใน

นิวเคลียสของโฮสต์เซลล์ทุกชนิดยกเว้น B-cell แต่ *E. hepatopenaei* จะเข้าไปแบ่งตัวได้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ได้เท่านั้นและสามารถแบ่งตัวได้ในไซโตพลาสซึมของทุกเซลล์ในผนังท่อตับและตับอ่อนยกเว้น F-cell (Stentiford and Bateman, 2007) ในระยะ plasmodia สามารถพบการเกิด vacuole ได้และยังสามารถพบลักษณะคล้ายกับกระเปาะ (bulb) ไมโครวิลไล (microvilli-like) รอบ ๆ ผนังเซลล์ในระยะ plasmodia ซึ่งการพัฒนาของระยะ plasmodia อาจเกิดจากโครงสร้างเล็กๆ ภายใน vacuole จากนั้นจึงเริ่มขยายตัวจนชิดกับขอบของผนัง vacuolar membrane จึงสามารถเห็นเป็นลักษณะเนื้อเยื่อหนา 2 ชั้น (double-layered membrane) ซึ่งอาจพบลักษณะการเกิดกระเปาะและลักษณะโครงสร้างคล้ายไมโครวิลไลได้ ไมโครสปอริเดียมชนิดนี้พบในกึ่งกลางลำตัวป่วยด้วยภาวะโตซาร์ร่วมกับเชื้อไวรัส ในอวัยวะน้ำเหลือง (lymphatic organ) และเนื้อเยื่อฮีมาโตพอยอิติก (hematopoietic tissue) (Anantasomboon et al., 2006) ซึ่งพบได้น้อยในกึ่งที่แข็งแรง เชื้อไมโครสปอริเดียมมีลักษณะเป็นเชื้ออวยโอกาสและก่อให้เกิดความรุนแรง เมื่อภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่นการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *E. bienuesi* ในผู้ป่วยโรคเอดส์ ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำเป็นระยะเวลานาน จัดลำดับอนุกรมวิธานของไมโครสปอริเดียมสกุลนี้ ดังนี้ (Desportes et al., 1985)

Phylum Microspora

Class Microsporea

Order Microsporidia

Family Enterocytozoonidae

Genus Enterocytozoon

เชื้อ *E. hepatopenaei* จัดอยู่ในสกุล *Enterocytozoon* จากรายงานการระบาดของโรคซึ่ขาวในกึ่งกลางลำตัวในประเทศเวียดนามและไทย พบว่ากึ่งที่มีการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* เมื่อได้รับเชื้อโรคอื่น ๆ หรือความเครียดและภูมิคุ้มกันที่ลดลง จะทำให้เชื้อไมโครสปอริเดียมเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นในปริมาณมาก เกิดการแย่งพลังงานจากไขมันที่ตับและตับอ่อนของกึ่ง ส่งผลให้กึ่งอ่อนแอและตายได้ง่าย (Flegel, 2012) เช่นเดียวกับในมนุษย์ เชื้อไมโครสปอริเดียมเป็นเชื้ออวยโอกาส และจะมีความรุนแรงมากขึ้น ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี หรือในผู้ป่วยที่มีภาวะเครียด ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ หรือภาวะใด ๆ ที่ส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำกว่าปกติ (Ghosh and Weiss, 2009)

2.5 การตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดียมในสิ่งมีชีวิต

2.5.1 การย้อมด้วยเทคนิคสีพิเศษ (modified trichrome stain)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อย้อมสี หากเป็นตัวอย่างของสิ่งขับถ่ายหรือของเหลวที่มีปริมาณมากจะนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 2,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาผสมเมียร์บนแผ่นสไลด์ หากเป็นตะกอนจากตัวอย่างอุจจาระจะนำมาผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงย้อมสี หากเป็นตะกอนจากตัวอย่างของเหลวจะผสม 10 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลิน หรือ โซเดียมอะซิเตต เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับย้อมสี ซึ่งโดยปกติแล้วสีย้อมจะติดสปอร์

ของไมโครสปอริเดียได้ยาก สำหรับสีที่นิยมใช้ คือ chromotrope 2R ในการย้อมสี สปอร์ ซึ่งสามารถย้อมติดสีได้ดี ส่วนสีย้อมพิเศษอื่น ๆ ที่นิยมใช้ในการย้อมได้แก่ Weber-Green modified trichrome stain และ Ryan-Blue modified trichrome stain โดยการย้อมด้วยสี Weber-Green modified trichrome stain เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า จะเห็นผนังสปอร์สีชมพูจนถึงแดง มีขอบเขตชัดเจน มองเห็น polar tube ได้โดยพื้นหลังจะติดสีเขียวอมน้ำเงิน การย้อมสีนี้อาจติดสีอาจติด แบทที่เรีย ยีสต์ หรือเศษเนื้อเยื่ออื่น ๆ ซึ่งสามารถแยกออกจากเชื้อได้โดยพิจารณารูปร่างและขนาด อย่างไรก็ตามควรมีแผ่นย้อมที่ให้ผลบวกเป็นตัวเปรียบเทียบด้วย โดยอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ย้อมสีจะให้ผลในการติดของสีที่ผนังสปอร์ต่างกัน การย้อมสีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือ การย้อมสีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะทำให้เห็นสปอร์ได้ชัดเจนขึ้น ส่วนการย้อมด้วยสี acid-fast trichrome stain สามารถใช้ย้อมดูตัวอย่าง สปอร์และโอโอไซต์ของ *Cryptosporidium* ได้ สำหรับการย้อมด้วยวิธี rapid-hot Gram chromotrope จัดเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้เวลาในการย้อมเพียง 5 นาที ให้สปอร์ติดสีม่วงเข้ม และพื้นหลังมีสีเขียวอ่อน ส่วนการย้อมสี Giemsa stain จากตัวอย่างอุจจาระจะเห็นสปอร์ติดสีน้ำเงินอ่อน ซึ่งแยกออกจากกันได้ง่ายกับเศษเนื้อเยื่ออื่น ๆ และตะกอนที่ปะปนอยู่มาก แต่ถ้าเป็นตัวอย่างของเหลวในร่างกายที่ไม่มีเศษตะกอนมาก การย้อมด้วยสี Giemsa สามารถทำได้และจะแยกสปอร์ของไมโครสปอริเดียออกจากตัวอย่างได้ง่ายกว่าในตัวอย่างอุจจาระ ส่วนการย้อมด้วยสี gram ใช้ในการแยกสปอร์ได้ โดยสปอร์ที่โตเต็มที่ (mature spore) จะติดสีม่วง ส่วนสปอร์ที่ยังไม่โต (immature spore) จะติดสีแดง สีชนิดอื่นที่สามารถใช้ย้อมได้ เช่น periodic acid Schiff (PAS) stain, silver stain และ Warthin-Starry stain

2.5.2 การส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (chemofluorescent optical brightening)

การย้อมสีตัวอย่างด้วยสีฟลูออเรสเซนต์จะย้อมติดกับส่วนไคตินของสปอร์ การตรวจดูการติดสีจะใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ตรวจดูและดูด้วยความยาวคลื่นจำเพาะ โดยแต่ละชนิดจะมีช่วงคลื่นที่ใช้ในการดูผลหลังจากการย้อมที่ความยาวคลื่นต่างกัน เช่น สี Calcofluor White 2MR ดูด้วยความยาวคลื่นช่วง 395-415 นาโนเมตร โดยสปอร์จะปรากฏเป็นสีน้ำเงินซีด มีสีน้ำเงินอมเขียวเรืองแสงตรงกลาง อย่างไรก็ตามสีชนิดนี้ไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อมากนัก เพราะสีชนิดนี้อาจติดเชื้อราหรือเศษเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่ผนังเซลล์มีองค์ประกอบของไคตินได้ หากเป็นตัวอย่างอุจจาระจะทำให้แปลผลคลาดเคลื่อนได้ เพราะมีเศษตะกอนที่สามารถติดสีฟลูออเรสเซนต์ได้ เช่นเดียวกันสีฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้ในการย้อมมีหลายชนิด เช่น Fungi-Fluor, Cellufluor, Fungiqua A และ Uvitex 2B เป็นต้น

2.5.3 เซลล์วิทยา (cytology)

วิธีนี้จะเก็บตัวอย่างจากของเหลวในร่างกาย แล้วนำตัวอย่างของเหลวที่ได้ ปั่นตกตะกอน เลือกลงเอาส่วนตะกอนที่ได้สเมียร์บนกระจกสไลด์และ ตรึงด้วยเมทานอลย้อมด้วยสี Giemsa แล้วนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า หรืออีกวิธีหนึ่งคือนำเนื้อเยื่อมาปั่นให้ตกตะกอน จะพบสปอร์ของไมโครสปอริเดียอยู่ในชั้นตะกอน ก่อนนำตะกอนไปย้อมสี ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจตัวอย่างจาก เนื้อเยื่อกระเจตที่เก็บมา หรือสารคัดหลั่งจากจมูก หรือสาร

คัดหลังอื่น ๆ ที่ได้จากร่างกายสามารถนำมาปั่นตกตะกอนและย้อมเพื่อตรวจหาเชื้อได้ ซึ่งสามารถทำได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ

2.5.4 จุลพยาธิวิทยา (histopathology)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อรักษาสภาพใน 10 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มอลิน จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการฝังในพาราฟิน แล้วนำไปย้อมสี hematoxylin-eosin เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะสามารถพบสปอร์ที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามการตรวจต้องใช้ความชำนาญในการแยกสปอร์ออกจากส่วนอื่น ๆ ในเซลล์ของโฮสต์

2.5.5 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy)

เป็นวิธีที่ดีที่สุด ที่ยืนยันการพบเชื้อไมโครสปอริเดียและยังสามารถใช้ดูรูปร่างของสปอร์รวมไปถึงการจำแนกชนิดของเชื้อจากโครงสร้างภายในสปอร์ได้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เพราะต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงและตรวจตัวอย่างได้ที่ละไม่มาก

2.5.6 อณูชีววิทยา (molecularbiology)

- 1) เทคนิคการตรวจด้วยสารเรืองแสง (fluorescent *in situ* hybridization : FISH) เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอภายในเนื้อเยื่อซึ่งเซลล์นี้ยังคงรูปร่างที่สมบูรณ์เหมือนเดิมอยู่ โดยออกแบบสายนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ หรือที่เรียกว่า probe เข้าไปโดยจะใช้ proteolytic enzyme เข้าไปช่วยย่อยผนังเซลล์ ให้ probe เข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับ probe ภายในเซลล์ได้ โดยสามารถติดตามผลที่ได้จากการเรืองแสง วิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *E. bienersi* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังลำไส้ที่ฝังอยู่ในพาราฟินได้ (Carville et al., 1997) แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้เครื่องมือและขั้นตอนในการแปลผลที่นาน เมื่อเทียบกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Hester et al., 2000)
- 2) เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction : PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่นหลายชนิด โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชั้นดีเอ็นเอแตกแล้วไวรัสหรือทำให้สามารถวิเคราะห์หรือตัดแยกชั้นดีเอ็นเอที่สนใจนั้นได้ ขั้นแรกต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจก่อนแล้วจึงสังเคราะห์ โอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ 1 คู่ (Weiss and Vossbrinck, 1999) แต่ละสายจะมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นเพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยนำสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ทั้งสองชนิดใส่รวมกับดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์ทั้งหมด เมื่อดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวจากอุณหภูมิที่สูงขึ้น จึงทำการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสคู่สมจับกับปลายของยีนที่ต้องการ ก็จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น ทำเช่นนี้ 30 ถึง 40 รอบ ชั้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการก็จะเพิ่มขึ้นเป็นล้าน ๆ เท่า (Joshi and Deshpande, 2011) ส่วนขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้เพื่อตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดีย นั้น สามารถตรวจ ได้จาก

เนื้อเยื่อหลายบริเวณ ตัวอย่าง เช่น ชิ้นเนื้อเยื่อจากลำไส้ หรือเยื่อเมือกที่ได้จากกระจกตา ตัวอย่างสิ่งขับถ่าย เช่น สิ่งขับถ่ายและปัสสาวะ สำหรับขั้นตอนในการสกัดอาจใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ การสกัดด้วยวิธีฟีนอลคลอโรฟอร์ม (phenol chloroform) หรือการตกตะกอนด้วยเอทานอลแอลกอฮอล์ (Ausubel et al., 1988) การสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดียช่วยเพิ่มข้อมูลการค้นพบไมโครสปอริเดียชนิดใหม่โดยตั้งแต่ปี ค.ศ.1999 ถึง ค.ศ. 2009 มี ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ เพิ่มขึ้นถึง 6,000 ชนิดฐานข้อมูลของ GenBank (Katinka et al., 2001) การเลือกตำแหน่งที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเชื้อไมโครสปอริเดียจะใช้ที่ตำแหน่งสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลสอาร์เอ็นเอ (small subunit rRNA) ซึ่งเชื้อที่มีการตรวจเป็นครั้งแรกคือ (*Vairimorpha necatrix*) (Vossbrinck et al., 1987)

2.5.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ ไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นวิธีตรวจเพื่อหาเชื้อ แต่เหมาะสำหรับการทำเพื่อศึกษาการตอบสนองต่อฤทธิ์ของยา และเหมาะสำหรับงานทดลองเพื่อทำงานวิจัยมากกว่าการตรวจคัดกรอง โดยมีไมโครสปอริเดียบางชนิดที่สามารถเลี้ยงในเซลล์ได้ เช่น *Encephalitozoon cuniculi* และ *E. Hellem* การเลี้ยงเซลล์ *E. intestinalis* โดยเซลล์ที่ใช้เลี้ยงจะเป็นเซลล์จากไตของลิงและกระต่าย หรือเซลล์ fetal lung fibroblast ของมนุษย์ อย่างไรก็ตามเชื้อบางชนิดยังไม่สามารถเลี้ยงได้ในระยะยาว เช่น *E. bienersi* ยังไม่แพร่หลายนัก และทำได้ยาก เพราะต้องใช้ปฏิกิริยาการทางภูมิคุ้มกันมายืนยันและจำแนกชนิด (Weber et al., 1999)

2.5.8 การตรวจทางซีรัมวิทยา (serological testing)

การตรวจทางซีรัมเป็นการรวมวิธีการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันไว้หลายวิธี เช่น carbon immunoassay, indirect immunofluorescent-antibody testing, enzyme linked immunosorbent assay, counter immune electrophoresis และ western blotting จะสามารถวัดระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ตอบสนองต่อเชื้อไมโครสปอริเดีย *E. cuniculi* ในสัตว์และเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. intestinalis* แต่การศึกษาทางซีรัมวิทยานั้น ยังไม่สามารถทำได้เนื่องจากการเลี้ยงเซลล์ยังไม่สามารถเลี้ยงเชื้อไมโครสปอริเดียในเซลล์ได้

2.6 การเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดีย

2.6.1 การเก็บตัวอย่างดิน

การเก็บตัวอย่างดินมีขั้นตอนหลัก ๆ ในการทำร่วมกัน คือ การแยกเอาสปอร์ออกจากส่วนของตะกอนดินหรืออนุภาคอื่น ๆ ในตัวอย่าง โดยสามารถเก็บตัวอย่างได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ต้องการเก็บ และชนิดของตัวอย่างที่ต้องการเก็บ การบดตัวอย่างดินจะช่วยให้อนุภาคอื่น ๆ ที่อยู่ในตัวอย่างดินมีขนาดเล็กลง และสะดวกต่อการเก็บสปอร์ หรือโอโอซิสต์ เช่น พบไข่พยาธิชนิด *Ascaris* ในดินทรายมากกว่าในดินเลน การบดตัวอย่างดินช่วยให้เก็บเกี่ยวไข่ *Toxocara* sp. ได้ดียิ่งขึ้น (Dada

and Lindquist, 1979) ในกรณีของปรสิตที่มีขนาดใหญ่ เช่น ไช้ของพยาธิสามารถนำมาแยกชนิดได้ โดยดูจากลักษณะภายนอก ซึ่งหากมีสิ่งแปลกปลอมหรืออนุภาคแขวนลอยอื่น ๆ มากจะทำให้การแยกชนิดของพยาธิทำได้ยากมากขึ้น ดังนั้นการเลือกขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างให้เหมาะสมถือเป็นเรื่องสำคัญที่จะช่วยให้การทำงานนั้นสะดวกมากขึ้น สามารถทำให้เก็บตัวอย่างจากโอโอซิสต์ของพยาธิและโปรโตซัวได้ดีขึ้น (Smith, 1998) ขั้นตอนที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างดิน คือ

- 1) การทำให้ลอย (floatation) ความถ่วงจำเพาะมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง สามารถให้ความถ่วงจำเพาะที่มีค่าตั้งแต่ 1.05 ถึง 1.18 หลักในการทำให้ลอย คือ อนุภาคที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าจะลอยขึ้นสู่ผิวของสารละลายที่ใส่ลงไปในตัวอย่าง แล้วเก็บเฉพาะส่วนบนของสารละลายออกมา วิธีการนี้จะต้องเลือกช่วงความเข้มข้นของความถ่วงจำเพาะของสารละลายให้เหมาะสม เพราะถ้าความเข้มข้นมากเกินไป จะทำให้เซลล์เสียรูปร่างได้ ใช้ความถ่วงจำเพาะ 1.12 ถึง 1.20 ผสมตัวอย่างดินกับน้ำเกลือเข้มข้นตั้งทิ้งไว้เวลานานประมาณ 5-20 นาที ในการเก็บโอโอซิสต์ (oocyst) ของคอกซิเดีย (Coccidia) เช่น เกลือซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$) และเกลือแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) อาจใช้น้ำตาลซูโคส (sucrose) คู่กับเกลือ เพื่อช่วยให้เก็บตัวอย่างได้ดียิ่งขึ้น
- 2) การทำให้ตกตะกอน (sedimentation) ใช้ในการตกตะกอนเพื่อหาตัวอย่างของไมโครสปอริเดีย สามารถใช้วิธีนี้วิธีเดียวหรือจะใช้วิธีอื่นร่วมด้วยก็ได้ โดยใช้หลักในการตกตะกอนให้สารละลายเกลือที่มีความเข้มข้น โดยความหนาแน่นของไข่พยาธิหรือสปอร์จะตกลงไปกับตะกอน ทั้งส่วนน้ำใสออกและเก็บแต่ส่วนของตะกอนที่ได้ไปตรวจ
- 3) การทำให้ลอยตัวด้วยเครื่องปั่น (centrifugal floatation) เป็นการรวมวิธี 2 วิธี คือ การปั่นตกตะกอนและการทำให้ลอยตัวรวมกัน เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีความสกปรกและมีอนุภาคแขวนลอยมาก อาจละลายตัวอย่างในสารละลายก่อนและกรองเอาส่วนอนุภาคที่มีขนาดใหญ่มา ๆ ออก แล้วปั่นเอาส่วนสารละลายที่ได้จากการกรองให้ตกตะกอน จากนั้นนำเฉพาะส่วนตะกอนที่ได้ไปทำให้ลอย (floatation) อีกครั้งโดยเติมสารละลายเกลือเข้มข้น แล้วนำไปปั่นโดยตัวอย่างที่มีมวลแน่นกว่าจะตกลงไปเป็นตะกอน ส่วนตัวอย่างที่ต้องการตรวจจะลอยขึ้นสู่ผิวด้านบนของสารละลาย
- 4) การทำให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่น (centrifugal sedimentation) เป็นการรวมวิธีการกรองเอาอนุภาคใหญ่ในตัวอย่างออกก่อนแล้วจึงปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอน การใช้วิธีนี้เก็บตัวอย่างจะเหมาะกับตัวอย่างที่มีอนุภาคอื่น ๆ มาก เช่น สิ่งขับถ่าย หรือน้ำเสีย สามารถผสม diethyl ether หรือ ethyl acetate เพื่อละลายไขมันที่ปนมากับตัวอย่าง

2.6.2 การเก็บตัวอย่างน้ำ

- 1) การตกตะกอน (sedimentation) เป็นการแยกเอาส่วนอนุภาคในน้ำที่มีน้ำหนักเบากว่าสปอร์ออก สามารถทำได้ โดยการตั้งน้ำตัวอย่างที่ต้องการตรวจไว้ แล้วเก็บเฉพาะส่วนตะกอนที่อยู่ก้นขวดนำไปตรวจเชื้อ
- 2) การจับตกตะกอน (flocculation) เป็นกระบวนการจับตัวกันของอนุภาคที่มีขนาดเล็กกับเชื้อให้เกิดเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้นจนสามารถตกตะกอนได้ง่ายขึ้น อนุภาคขนาดเล็กที่

สามารถใช้เข้าจับกับปรสิตที่มีรายงานการใช้ เช่น aluminum sulfate และ calcium carbonate ในการตะกอนไอโอซิสต์ของ *Cryptosporidium* หรือ การใช้ calcium carbonate ในการตกตะกอนซิสต์ (cyst) ของปรสิต *Giardia* เป็นต้น (Vesey et al, 1993)

- 3) การตกตะกอนด้วย formalin ethyl acetate concentration การตกตะกอนนิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อปรสิตในสิ่งขับถ่าย โดยการใช้การปั่นตัวอย่างผ่านความเข้มข้นของสารเคมีเพื่อแยกเอาไขมันหรืออนุภาคแขวนลอย ที่อยู่ในตัวอย่างให้ติดอยู่กับชั้นของ ethyl acetate ส่วนชั้นล่างสุดที่ติดกับตะกอนด้านล่างจะเป็นชั้นที่มีเชื้อปรสิตอยู่ใน formalin วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ประหยัด แต่มีข้อเสีย คือ เซลล์ระยะ trophozoite ของปรสิตที่ได้หลังจากการตกตะกอน จะมีรูปร่างไม่สมบูรณ์ และการดูดเอาส่วน formalin ที่ติดกับตะกอนตัวอย่างเข้ามาจะรบกวนการสกัดดีเอ็นเอของปรสิตได้
- 4) การกรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filtration) ในกรณีที่ตัวอย่างน้ำมีความขุ่นน้อย จะใช้ตัวอย่างน้ำประมาณ 10–40 ลิตร แต่หากตัวอย่างน้ำมีความขุ่นมาก อาจใช้ตัวอย่างน้ำเพียง 1–2 ลิตร ชนิดของกระดาษกรองอาจมีผลต่อการเก็บเกี่ยวสปอร์ของเชื้อ กระดาษกรองชนิด cellulose acetate จะเก็บเกี่ยวตัวอย่างของสปอร์ของ *Cryptosporidium* ได้มากกว่าชนิด polycarbonate membrane (Ongerth and Stibbs, 1987) ทั้งนี้การเลือกชนิดของกระดาษกรอง จะต้องคำนึงถึง ความเหมาะสมสำหรับตัวอย่างน้ำที่ต้องการตรวจ เพราะหากต้องการตรวจ ตัวอย่างน้ำปริมาณมากและมีความขุ่นมาก จะเกิดการอุดตันได้ง่าย ทำให้ต้องเปลี่ยนกระดาษกรองหลายแผ่นเช่นกัน
- 5) การกรองโดยใช้เครื่องกรองแบบ cartridge filtration เครื่องกรองแบบ cartridge filtration เป็นเครื่องกรองที่พัฒนามาจากวิธีการกรองแบบผ่านกระดาษกรอง โดยเครื่องกรองจะมีแผ่น polypropylene ขนาด 1 ไมโครเมตร เป็นการกรองขั้นแรก มีการทดลองในการตรวจหาปรสิตจากตัวอย่างน้ำ 100-1000 ลิตร ที่ความเร็วไหลผ่าน 1-5 ลิตรต่อนาที เก็บตัวอย่างที่กรองได้จากแผ่น polypropylene มาล้างเพื่อให้สปอร์ที่ติดค้างอยู่หลุดออกมาและสามารถนำตัวอย่างน้ำที่ล้างไปสกัดดีเอ็นเอได้ สำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา (USEPA) ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium* และ *Giardia* ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำที่ใช้เป็นแหล่งน้ำอุปโภคและบริโภค แม้จะได้รับการพัฒนามาจากการตกตะกอน โดยใช้กระดาษกรองและสามารถกรองน้ำได้ในปริมาณมาก การใช้เครื่องกรอง cartridge filtration มีข้อจำกัดโดยเฉพาะในตัวอย่างที่มีความขุ่นมาก ๆ จะทำให้เกิดการอุดตันได้ง่าย ส่งผลให้กรองช้าลงได้หรือต้องทำการล้างและเปลี่ยนแผ่นกรองตัวอย่างบ่อยขึ้น
- 6) การปั่นเหวี่ยง centrifugation techniques เพื่อตรวจหาปรสิต ซึ่งการตรวจหาปรสิตแต่ละชนิดจะใช้ความเร็ว ปริมาณตัวอย่างและเวลาที่ทำแตกต่างกัน ต้องปรับหาวิธีในการปั่นเหวี่ยงให้เหมาะสม สำหรับเครื่องมือที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงนั้น สามารถหาได้ง่ายและมีในห้องปฏิบัติการทั่วไป ปริมาณของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสามารถปรับภาชนะที่ใช้ปั่นเหวี่ยงได้ตามปริมาตรของตัวอย่างที่จะตรวจ ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำเครื่อง continuous flow

centrifugation (CFC) เข้ามาพัฒนา เพื่อการเก็บตัวอย่างในปริมาณมากตรวจ ซึ่งมีข้อดีคือ เครื่องจะสามารถรองรับตะกอนที่เกิดจากการปั่นได้จนถึงปริมาณสูงสุดที่เครื่องจะสามารถทำงานได้ เครื่อง CFC สามารถตรวจระยะโอโอซิสต์ของเชื้อ *Cryptosporidium parvum* ได้ มีการพัฒนาระบบการปั่นเหวี่ยงแบบนี้ให้สะดวก สามารถพกพาได้ง่าย ซึ่งข้อดีของวิธีการนี้ คือ สารแขวนลอยจากตัวอย่างจะไม่ขัดขวางการเก็บด้วยการปั่นเหวี่ยง (Higgins et al., 2003)

เชื้อไมโครสปอริเดียหลายชนิดที่เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร สามารถติดได้ทั้งในคนและสัตว์ การติดต่อหรือการได้รับเชื้อจะเกิดจากการกลืนกินสปอร์ที่คงทนอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน โดยสามารถพบสปอร์ของเชื้อไมโครสปอริเดียในน้ำได้หลายบริเวณในบ่อเลี้ยง เช่น บริเวณผิวน้ำ กลางน้ำ หรือแม้กระทั่งน้ำบริเวณใต้บ่อน้ำที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การตรวจหาเชื้อปรสิตปนเปื้อนในน้ำ มีการศึกษาในตัวอย่างน้ำที่ใช้เพื่อการอุปโภคและบริโภค ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในคนและสามารถติดสู่คนได้ โดยการดื่มน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน เป็นสาเหตุให้เกิดโรคท้องร่วงได้ เช่น เชื้อ *Giardia*, *Cryptosporidium* และ *Enterocytozoon* ซึ่งปรสิตในกลุ่มนี้วงจรชีวิตจะมีหลายระยะ ทั้งที่อยู่ในร่างกายของโฮสต์ และระยะที่อยู่นอกร่างกายโฮสต์ ในระยะที่อยู่นอกร่างกายของโฮสต์ จะเป็นระยะที่มีการขับเอาโอโอซิสต์ ซีสต์ หรือสปอร์ (spore) ออกมากับสิ่งขับถ่ายปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม เช่น ในดินและในน้ำ เพื่อรอเข้าสู่โฮสต์ใหม่และเพิ่มจำนวนในร่างกายของโฮสต์ใหม่ หลังจากที่ได้รับเชื้อ *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon* ซึ่งเชื้อ *Giardia* และเชื้อกลุ่มไมโครสปอริเดียชนิดอื่น สามารถแพร่กระจายผ่านทางน้ำและดินได้ จึงสามารถใช้เป็นตัวช่วยในการประเมินสุขภาพอนามัยของสิ่งแวดล้อม ที่อยู่โดยรอบของมนุษย์ทั้งสิ่งขับถ่ายและเครื่องดื่มได้

วิธีการตรวจเชื้อไมโครสปอริเดียจากตัวอย่างน้ำที่มีการตรวจ คือ การตรวจตัวอย่างน้ำด้วยวิธีการกรองหรือการปั่นตัวอย่างน้ำให้สปอร์ของเชื้อตกตะกอน จากนั้นนำตัวอย่างสปอร์ที่ได้เข้าสู่ขั้นตอนที่ใช้ตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดียต่อไป ขั้นตอนการเก็บสปอร์จากตัวอย่างน้ำนั้น ยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับการเก็บตัวอย่าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เพื่อเก็บสปอร์ตัวอย่างน้ำ เช่น การใช้เครื่องกรองน้ำแบบ CFC, เครื่อง continuous separation channel centrifugation หรือการใช้เครื่อง immunomagnetic separation (IMS) ที่ใช้ตรวจหาสปอร์ของเชื้อไมโครสปอริเดียสำหรับการผลิตน้ำบริสุทธิ์ (ultrapure water) ซึ่งมีความแม่นยำในการตรวจหาสปอร์ในตัวอย่างน้ำถึง 78 – 90 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้วิธี real-time PCR ตรวจเชื้อ *Cryptosporidium* สำหรับตัวอย่างน้ำที่มีความขุ่นมาก และมีความสกปรก เช่น มีการปนเปื้อนสิ่งขับถ่ายของสัตว์ หรือ อนุภาคต่าง ๆ ในน้ำมาก อาจส่งผลกระทบต่อวิธีการเก็บตัวอย่างและการตรวจหาสปอร์ของเชื้อไมโครสปอริเดียในตัวอย่างน้ำนั้นได้ จึงจำเป็นต้องใช้วิธีการกรองอนุภาคแขวนลอยและสิ่งสกปรกที่อยู่ในน้ำออกไป ด้วยวิธีการกรองผ่าน filter membrane เพื่อกำจัด PCR inhibitor ออกจากตัวอย่างน้ำ (Ghosh and Weiss, 2009)

การแพร่กระจายของเชื้อไมโครสปอริเดีย เป็นสิ่งที่ต้องเฝ้าระวัง แม้จะไม่ใช่การแพร่กระจายจากอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่การใช้น้ำเสียหรือมูลสัตว์ไปทำเป็นปุ๋ย เป็นการทำให้สปอร์ของเชื้อ ติดอยู่ตามพืชที่ใช้ปุ๋ยมูลสัตว์ เช่น ผลของสตรอเบอร์รี่ ต้นข้าว หรือผักชนิดอื่น ๆ ที่ปลูกด้วยมูลสัตว์ สามารถพบเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *Encephalitozoonidae* ได้ถึง 3 ชนิด ซึ่งอาจปนเปื้อน

มาจากการใช้ปุ๋ย มูลสัตว์ หรือการใช้น้ำเสียที่บำบัด ไม่สะอาดเพียงพอในการเพาะปลูก ในทวีปยุโรป และอเมริกาเหนือ พบเชื้อไมโครสปอริเดีย *E. bienersi* ในมูลของนกพิราบ ซึ่งมนุษย์สามารถรับสปอร์เข้าสู่ร่างกายผ่านการหายใจ อีกทั้งยังพบเชื้อชนิดนี้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงสุนัขและแมวได้อีกด้วย ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีพีซีอาร์ จึงเป็นวิธีที่มีประโยชน์เพื่อทราบถึงปัจจัยเสี่ยงที่มนุษย์สามารถได้รับเชื้อไมโครสปอริเดียเข้าสู่ร่างกายได้

2.7 การแพร่เชื้อ (transmission of disease)

เชื้อโรคจะหาโฮสต์ใหม่เพื่อเข้าไปเพิ่มปริมาณเชื้ออยู่ตลอดเวลา การเพิ่มจำนวนในโฮสต์ใหม่ก็จะก่อให้เกิดโรคและแพร่กระจายเชื้อสู่โฮสต์ต่อไปเช่นนี้เรื่อยๆ ซึ่งการได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายมีรูปแบบแตกต่างกันดังนี้

2.7.1 การติดต่อทางตรง (direct contact)

เป็นการได้รับเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายโดยตรง เช่น การสัมผัสกับเชื้อโรค การไชของเชื้อเข้าสู่ร่างกายของโรคฉี่หนู (leptospirosis) ที่สามารถไชผ่านการสัมผัสกับสิ่งขับถ่ายของสัตว์ที่ได้รับเชื้อ หรือการได้รับเชื้อผ่านทางกรกินจากการปนเปื้อนในอาหาร (food-borne infection) หรือน้ำ (water-borne infection) หรือการกินสิ่งขับถ่ายที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนอยู่ (faecal-oral infection)

2.7.2 การติดต่อทางอ้อม (indirect contact)

เป็นการได้รับเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายทางอ้อม เชื้อโรคบางชนิดจำเป็นต้องอาศัยสัตว์หรือสิ่งแวดล้อมที่ช่วยในการพาเชื้อเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์ เช่น สัตว์พาหะ หรือสัตว์ที่มีความสามารถในการได้รับเชื้อโรคนั้นได้และไม่แสดงอาการของโรค หรืออาการของโรคที่ได้รับนั้นเกิดขึ้นน้อยมากจนไม่อาจสังเกตเห็นได้ การได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์พาหะ อาจเป็นเพียงช่วงเวลาสั้น ๆ หรืออาจเป็นระยะเวลานาน เมื่อสัตว์พาหะได้รับเชื้อแล้วจะสามารถกระจายเชื้อไปสู่โฮสต์ใหม่หรือสิ่งแวดล้อมโดยรอบ เพื่อเพิ่มโอกาสให้เชื้อโรคได้เข้าสู่ร่างกายของโฮสต์โดยการติดผ่านสิ่งแวดล้อมนั้นได้มากยิ่งขึ้น สัตว์พาหะเป็นสิ่งสำคัญในวงจรการเกิดโรค เมื่อเกิดโรคระบาดและสัตว์ส่วนใหญ่แสดงอาการป่วยให้เห็น การเฝ้าติดตามสัตว์ทุกชนิดที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกับที่เกิดการระบาดของโรคนั้น อาจจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีโอกาสในการเป็นสัตว์พาหะของโรคระบาดที่เกิดขึ้นในสัตว์ที่ป่วยส่วนใหญ่ได้ เชื้อโรคบางชนิดสามารถอาศัยอยู่นอกร่างกายของโฮสต์ได้เป็นเวลานาน ๆ และในบางเชื้อโรคสัตว์บางชนิดก็สามารถได้รับเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และสามารถติดไปสู่สัตว์ชนิดอื่น ๆ ได้ ดังนั้นความสำคัญในการเฝ้าระวังสัตว์ที่สามารถเป็นสัตว์พาหะ จึงเป็นแนวทางสำคัญในการป้องกันการเกิดโรครุนแรงได้อีกวิธีหนึ่ง โดยชนิดของสัตว์พาหะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

- 1) Biological vector สัตว์พาหะที่พบในกลุ่มนี้ส่วนมากจะเป็นสัตว์ในกลุ่ม Arthropod โดยปรสิตที่อาศัยอยู่ในพาหะนั้นต้องมีการเปลี่ยนแปลงในด้าน การเจริญเติบโต การพัฒนา หรือการแบ่งตัว พาหะใดที่ปรสิตสามารถอาศัยอยู่ภายใน

ร่างกายและปรสิตมีการเจริญเติบโตหรือแบ่งตัวเป็นสัตว์พาหะแบบ biological vector ได้ เช่น ยุงก้นปล่องเพศเมีย (*Anopheles* sp.) เป็นพาหะของเชื้อมาลาเรีย การติดเชื้อของสัตว์พาหะกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 แบบ ได้แก่ propagative transmission เชื้อโรคมักมีการเพิ่มจำนวน แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามการเจริญเติบโต เช่น ไวรัส Arbovirus ที่เพิ่มจำนวนในต่อมน้ำลายของยุง cyclopropagative transmission คือเชื้อโรคมักมีการเพิ่มจำนวน และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามการเจริญเติบโต เช่น เชื้อมาลาเรียเพียงแค่ว่า 1 ไซโกต (zygote) ก็สามารถปลดปล่อย สปอโรซอยต์ (sporozoites) ได้มากกว่า 200,000 สปอโรซอยต์ และ cyclodevelopmental transmission เชื้อโรคมักมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามการเจริญเติบโต แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวน เช่น โรคเท้าช้าง (elephantiasis)

- 2) Mechanical vector เป็นพาหะที่ปรสิตซึ่งอาศัยอยู่ไม่มีการเจริญเติบโตหรือเปลี่ยนแปลงใด ๆ ตัวอย่างเช่น แมลงวันบ้านเป็นพาหะของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อโปรโตซัวหลายชนิดที่ปนเปื้อนมากับกองของสิ่งขับถ่าย (Gubler, 2009)

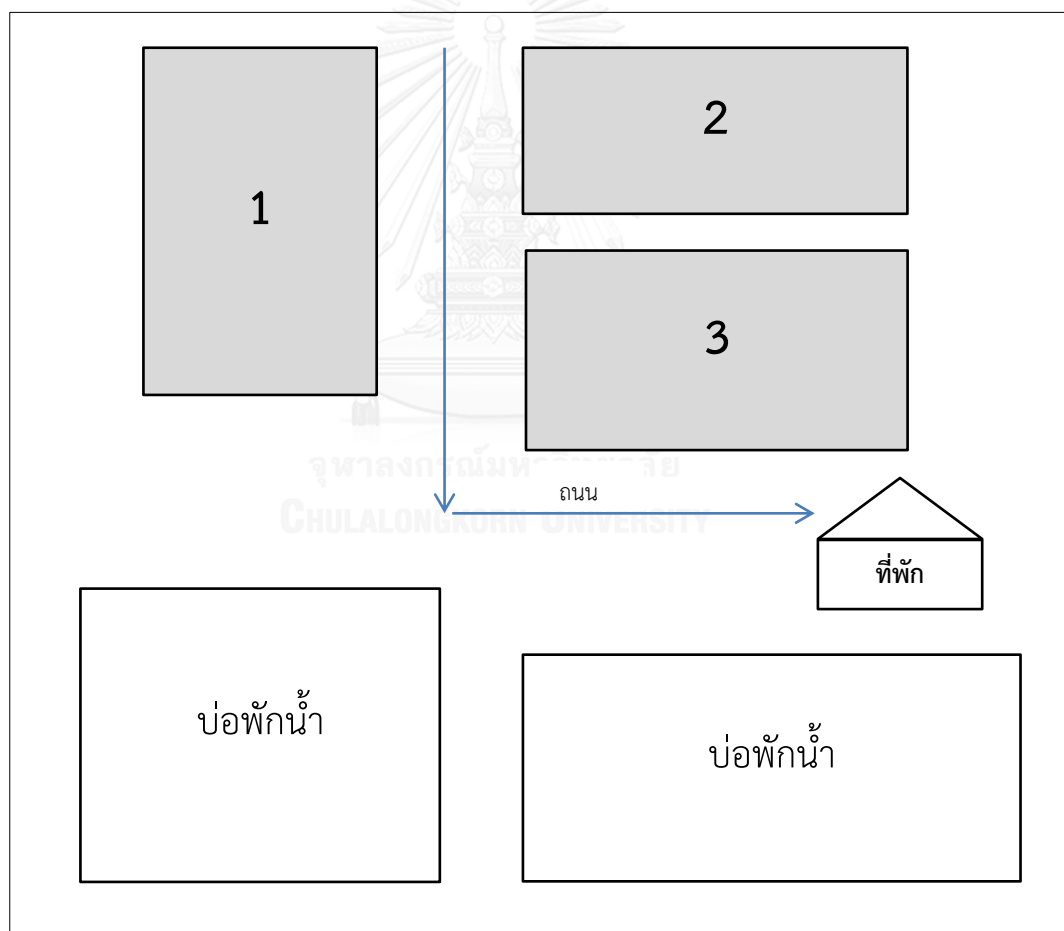
จะเห็นได้ว่าปัจจัยที่อาจโน้มนำให้สัตว์เกิดโรคนั้นมีมากมาย สัตว์ทุกชนิดในฟาร์มอาจได้รับเชื้อ และสามารถถ่ายทอดเชื้อเข้าสู่ฟาร์มกึ่งได้ ในกรณีของเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatoopenaei* มีรายงานการศึกษาถึงการทดลองการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อโดยการให้กึ่งที่ไม่มีเชื้อกิน กึ่งที่มีเชื้อเข้าไป เมื่อตรวจอีกครั้งพบว่ากึ่งสามารถติดเชื้อ *E. hepatoopenaei* ไมโครสปอริเดียชนิดนี้เป็นเชื้อที่มีการเพิ่มจำนวนที่ทางเดินอาหารดังนั้นจะปลดปล่อยสปอร์ออกมาพร้อมกับสิ่งขับถ่าย ทำให้เชื้อมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในสิ่งแวดล้อมและสามารถติดสู่โฮสต์อื่นได้ด้วยการกินโฮสต์ที่ติดเชื้อ หรือสิ่งที่ขับถ่ายออกมาจากร่างกายของโฮสต์ติดเชื้อ เชื้อ *E. hepatoopenaei* ยังขาดข้อมูลการเป็นพาหะของสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ ว่าสามารถมีโอกาสได้รับเชื้อและสามารถเป็นสัตว์พาหะของเชื้อได้หรือไม่ จึงเป็นที่มาของความสำคัญในการทดลองหาความสามารถในการติดเชื้อ *E. hepatoopenaei* ในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมภายในบ่อกึ่งขาวแวนนาไม และความสามารถในการเป็นสัตว์พาหะที่อาจถ่ายทอดเชื้อเข้าสู่บ่อกึ่งได้

บทที่ 3

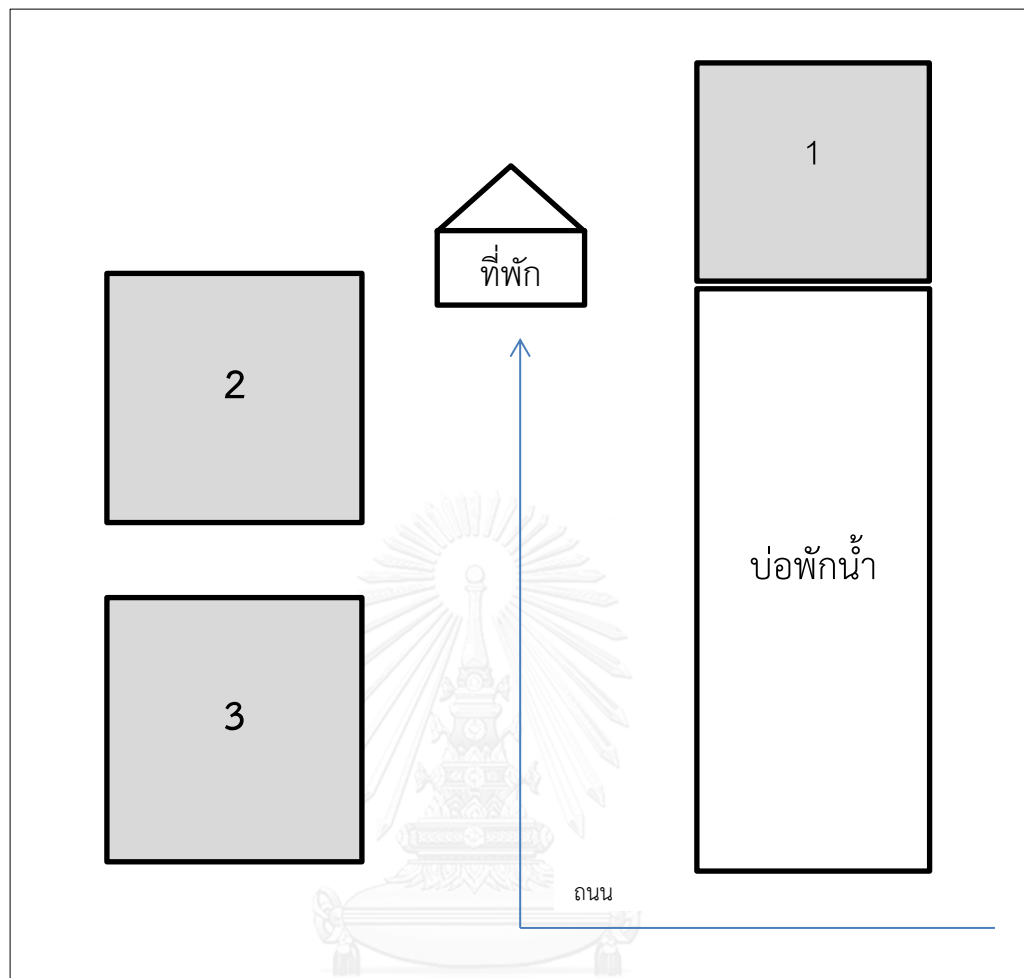
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

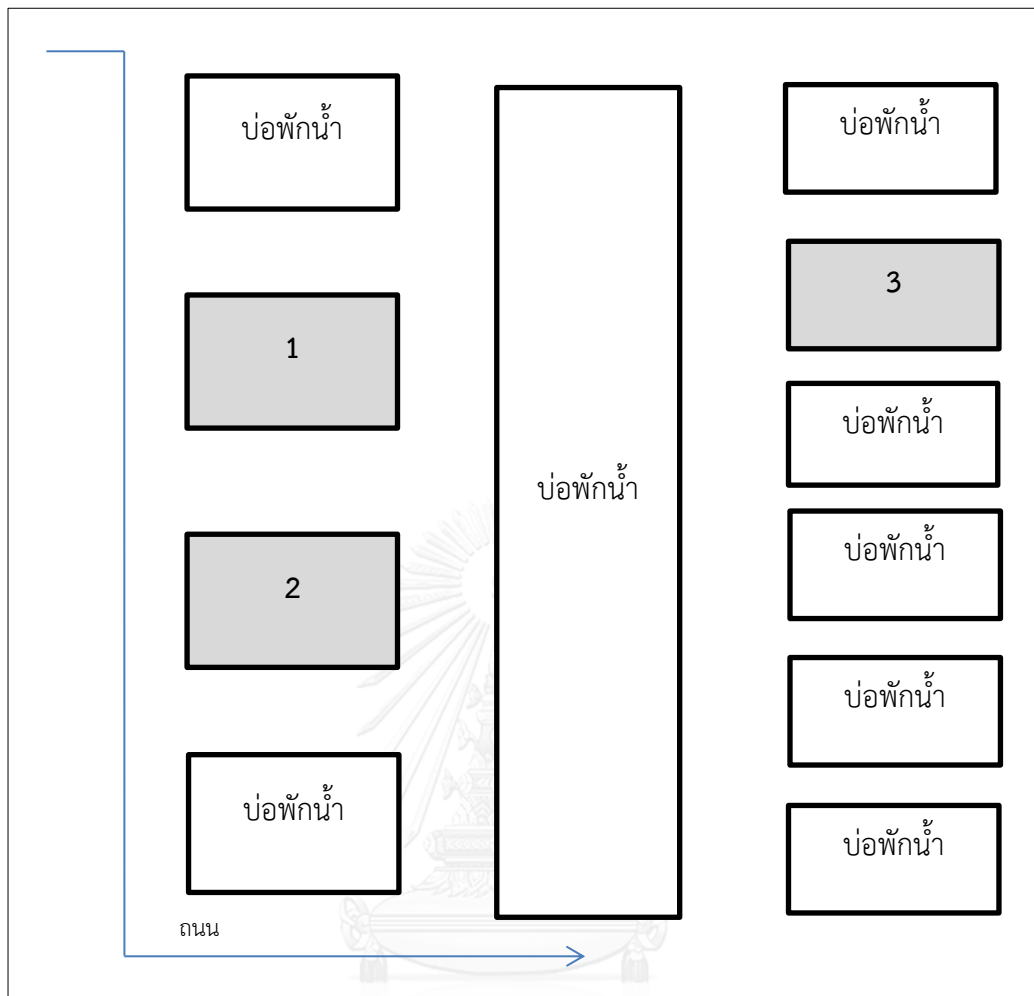
ในการทดลองนี้ผู้วิจัยทำการเลือกฟาร์มกุ้งขาวแวนนาไมจำนวน 4 ฟาร์ม ที่มีประวัติการติดเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* โดยเป็นฟาร์มกุ้งที่เลี้ยงในน้ำจืดจากจังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 2 ฟาร์ม และฟาร์มกุ้งที่เลี้ยงในน้ำเค็มจากจังหวัดจันทบุรีจำนวน 2 ฟาร์ม และทำการสุ่มตัวอย่างบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 3 บ่อ จากบ่อทั้งหมดภายในฟาร์ม เริ่มทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 โดยทำการเก็บตรวจตัวอย่าง ในวันที่เริ่มเลี้ยงและวันสิ้นสุดการเลี้ยง ซึ่งมีแผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่าง (ภาพที่ 1-4)



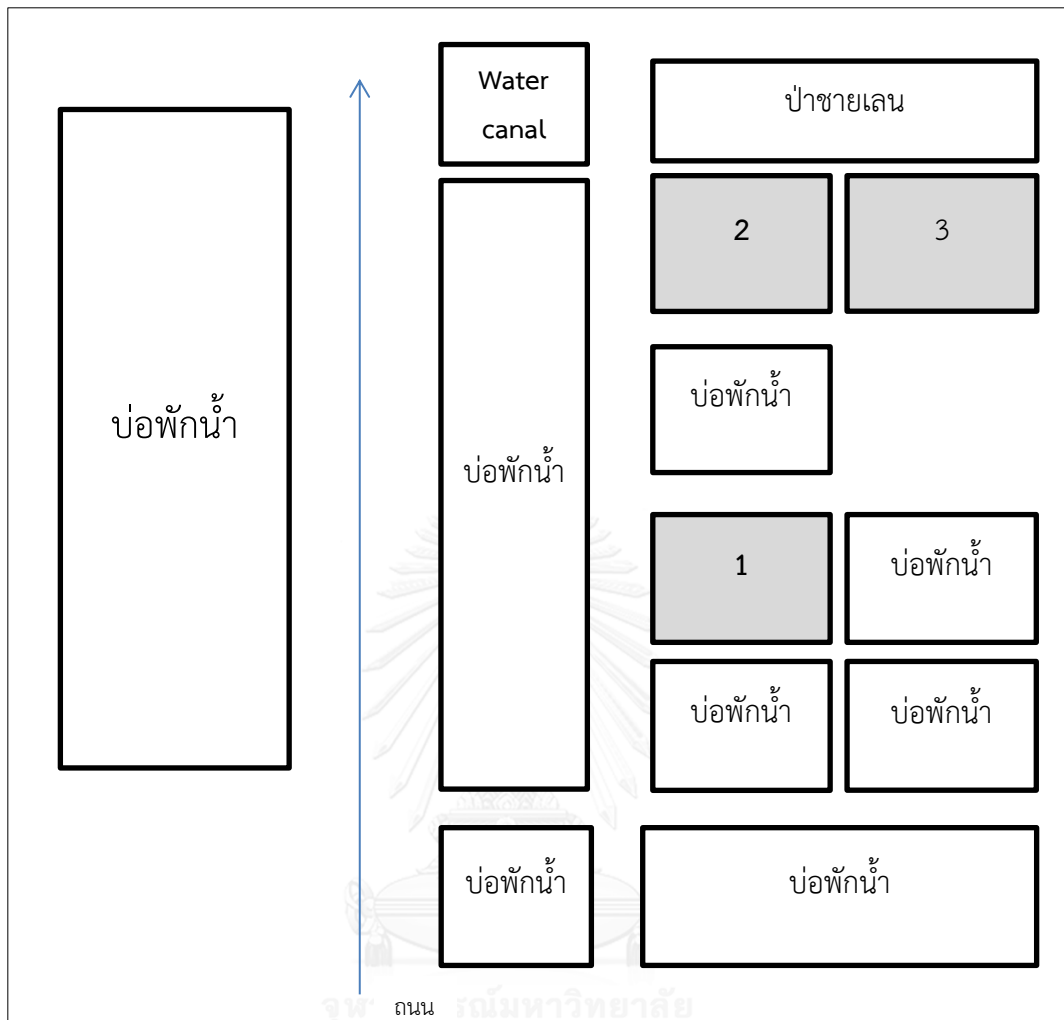
ภาพที่ 1 แผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 1



ภาพที่ 2 แผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 2



ภาพที่ 3 แผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 1



ภาพที่ 4 แผนผังและตำแหน่งบ่อที่เก็บตัวอย่างในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 2

3.2 วิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษา

3.2.1 การเก็บตัวอย่างกุ้ง

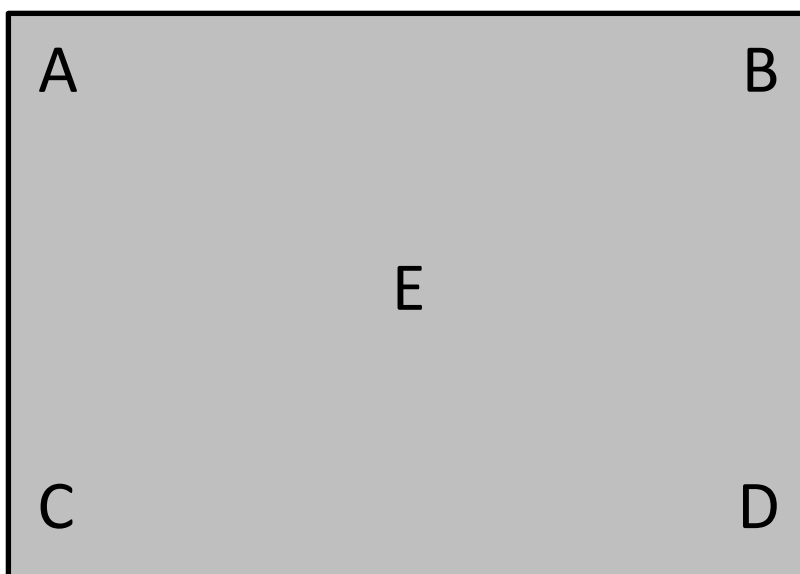
ทำการเก็บตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวา ก่อนเริ่มการเลี้ยงจำนวน 200 ตัวนำมารวมกันเป็น 10 ตัวอย่างต่อบ่อ เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอของวันที่เริ่มเลี้ยง และเก็บตัวอย่างกุ้งระยะโตเต็มวัย หลังสิ้นสุดการเลี้ยงอายุระหว่าง 48 - 60 วัน จำนวน 100 ตัว ต่อ 1 บ่อ ใส่ในถุงพลาสติกและเก็บในกล่องโฟมที่ภายในใส่น้ำแข็งเพื่อรักษาความเย็น ทำการบันทึกข้อมูลเบื้องต้น ได้แก่ น้ำหนักและความยาวของกุ้ง เพื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักและความยาวของกุ้ง จากนั้นทำการแยกอวัยวะภายในโดยทำการเก็บเนื้อเยื่อส่วนตับและตับอ่อนและลำไส้ โดยแบ่งตัวอย่างกุ้งจาก 100 ตัวอย่างนำมารวมกันเป็น 10 ตัวอย่างต่อบ่อสกัดดีเอ็นเอในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง เพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา (Yamane, 1967) ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction PCR) ต่อไป

3.2.2 การเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่

ทำการเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำที่มีขนาดตัวใหญ่กว่า 2 มิลลิเมตร ที่พบในบ่อกุ้งฟาร์มละ 5 ชนิด ชนิดละ 10 ตัว เนื่องจากมีการระบาดของโรคในฟาร์มกุ้งที่ทำการศึกษา จึงมีข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่าง บันทึกข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่าง ถ่ายรูปเพื่อระบุจำแนกชนิด โดยดูจากลักษณะสัญญาณวิทยานอกของร่างกาย ในกรณีที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ จะทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำการระบุชนิด โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสด้วยไพรเมอร์สากล ที่จำเพาะต่อยีนสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลาร์เอ็นเอ (small subunit rRNA gene: SSU rRNA)

3.2.3 การเก็บตัวอย่างน้ำและดินในบ่อ

เก็บตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 ลิตร และดินปริมาณ 100 กรัม จากบริเวณ 5 จุดภายในบ่อ โดยตำแหน่งที่เก็บ จะเก็บจากมุมทั้ง 4 ของบ่อและ อีก 1 จุดตรงกลางบ่อ (ภาพที่ 5) เพื่อนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอตรวจสอบหาสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ในสิ่งแวดล้อม โดยเก็บตัวอย่างดินและน้ำ 2 ครั้ง คือ ก่อนปล่อยลูกกุ้งและหลังจับกุ้ง



ภาพที่ 5 แผนผังการกำหนดจุดการเก็บตัวอย่างดินและน้ำ ตามวิธีของ Boyd (1990)

- A, B, C, D แสดงจุดเก็บตัวอย่างดินและน้ำที่มุมบ่อ
- E แสดงจุดเก็บตัวอย่างดินและน้ำกลางบ่อ

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ

การสกัดดีเอ็นเอ ทำได้โดยการใช้ AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER Corp, No. K-3032) ซึ่งมีวิธีในการสกัดดังนี้ นำตัวอย่างเนื้อเยื่อปริมาณ 25-50 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วเติม tissue lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นบดเนื้อเยื่อให้ละเอียด และทำการกำจัดโปรตีนโดยเติมสาร proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง ปั่นให้ตกตะกอนแล้วดูดเฉพาะส่วนใส เติม binding buffer (GC) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย pipette ถ่ายตัวอย่างใส่หลอด binding column tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000g เป็นเวลา 1 นาที นำเฉพาะส่วนกรอง ใส่ในหลอด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่ หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยการล้างสารเคมีออกโดยใส่ washing buffer 1 (W1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000g เป็นเวลา 1 นาที และใส่ washing buffer 2 (W2) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง เพื่อกำจัดเอ

ทานอลแอลกอฮอล์ออกจนหมด ขั้นตอนสุดท้ายนำเฉพาะส่วนของคอลัมน์ (binding column tube) ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสาร elution buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการเก็บเฉพาะดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ ปริมาตรสุดท้าย 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำ

นำตัวอย่างน้ำจากบ่อกึ่งขาวปริมาณ 1 ลิตร กรองผ่าน filter membrane Schrlau[®] ขนาด 0.45 ไมครอน (สุกัญญา, 2547) นำส่วนที่ติด filter membrane ไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด DNAzol[®] Reagent (Invitrogen TM, No.10503-027, USA) ในการสกัด โดยนำกระดาศกรองที่ได้จากการกรองน้ำตัวอย่างใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารสกัด DNAzol[®] Reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าสารนาน 5 นาที ให้อนุภาคที่ติดอยู่บนแผ่นกระดาศกรองหลุดออกมากับสารละลาย นำกระดาศกรองออก และเอาเฉพาะสารละลาย ตัวอย่างที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนของเหลวที่แยกชั้นจาก ตะกอนที่ไม่ละลายน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติมเอทานอล แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่แยกออกจากตะกอนดีเอ็นเอทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 0.8-1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง และทิ้งส่วนที่เป็นตะกอนไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เอทานอลแอลกอฮอล์ระเหยจนหมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Elution buffer ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้สารละลายดีเอ็นเอ เพื่อนำไปตรวจสอบหาการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินจากบ่อกึ่งขาวปริมาณ 0.25-1 กรัม ไปสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Soil DNA Isolation Mini Kit, (FavorPrep TM ,No.FASOI001) (Jedryczka et al., 2014) ทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยใส่ตัวอย่างดินปริมาณ 0.25-1 กรัมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มี glass bead แล้วเติมสารSDE 1 buffer 1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสาร SDE 2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว โดยนำหลอดตัวอย่างไปแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 5 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่างที่ได้ นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนของเหลวออกเหลือไว้เฉพาะตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด ใส่ elution buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร จนตะกอนดีเอ็นเอละลายหมด ใส่สารSDE 3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 2 นาที ดูดเฉพาะส่วนใสใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ใส่สาร SDE 4 ปริมาตร 1 เท่า และเอทานอลแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์

ปริมาตร 1 เท่าของของเหลวที่ได้ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ถ่ายตัวอย่างใส่หลอด SDE column tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 1 นาที นำเฉพาะส่วนกรอง ใส่ในหลอด 2 มิลลิลิตร จากนั้นหลอดใหม่เติมสารละลาย wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 3 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลแอลกอฮอล์ให้หมด ขั้นตอนสุดท้ายนำเฉพาะคอลัมน์ (SDE column tube) ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสาร elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการเก็บเฉพาะดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้ว ไปตรวจสอบหาการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* หรือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.4 ตรวจสอบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มจำนวนยีนสมอลซับยูนิตโรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (small subunit rDNA gene หรือ SSU rRNA) จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ กุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ ดิน และน้ำที่สกัดดีเอ็นเอไว้ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน SSU rRNA ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้สารเคมีต่าง ๆ ตามวิธีของ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งส์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดังนี้

EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)	5.0	ไมโครลิตร
Molecular grade water	3.6	ไมโครลิตร
Forward primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.2	ไมโครลิตร
Reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์	0.2	ไมโครลิตร
DNA template	1.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด	10.0	ไมโครลิตร

งานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Thermal cycler) (BIORAD®) และโปรแกรมอุณหภูมิที่ตั้ง ดังนี้

ขั้นตอน Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	3	นาที
ขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	5	วินาที
ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	5	วินาที
ขั้นตอน Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	25	วินาที
ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extension จนครบ 40 รอบ		
ขั้นตอน Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	5	นาที
ขั้นตอน Final hold เก็บรักษา PCR product ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำหลอดปฏิกิริยาออกจากเครื่อง		

3.5 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาแลงโซโฟลิเมอเรส โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทำได้โดยเตรียมเจลอะกาโรส (agarose gel) ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยลงผงอะกาโรส 2 กรัม ละลายกับบัฟเฟอร์ Tris-boric acid disodium EDTA: TBE สำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลอมผงอะกาโรสให้ละลายจนหมดโดยใช้ไมโครเวฟ จากนั้นเทลงบนภาชนะที่เตรียมไว้ให้เจลมีความหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ทำหลุมสำหรับใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ และนำเจลที่ได้ใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส และใส่บัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล การแยกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ ทำได้ด้วยสนามไฟฟ้าที่ดีเอ็นเอขับเคลื่อนจากขั้วลบไปยังขั้วบวก นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมบนเจล เมื่อใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอจนครบ ให้ใส่ 100 bp. DNA ladder (Invitrogen[®], Grand Island, NY, USA) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมแรก เพื่อใช้บอกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ สกัดแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำเจลไปย้อมด้วยสีเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างสีย้อมออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง UV transilluminator โดยดูการปรากฏของแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งมีขนาด 384 bp. จากนั้นทำการบันทึกภาพเจล ด้วยกล้องถ่ายภาพ

3.6 การทำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาแลงโซโฟลิเมอเรสให้บริสุทธิ์

ทำเจลอะกาโรสที่มีแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ขนาด 384 bp. ให้บริสุทธิ์ ด้วย AccuPrep[®] Gel Purification Kit (BIONEER Corp, No. K-3035-1) ประเทศเกาหลีใต้ โดยตัดชิ้นส่วนของเจลที่มีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติพิวจ์ แล้วเติมสาร buffer 1 ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักชิ้นเจล จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเจลละลายดีแล้ว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ปั่นให้ตกตะกอนแล้วดูเฉพาะส่วนใส จากนั้นเติมไอโซโพรพานอลแอลกอฮอล์ ปริมาตรเท่ากับน้ำหนักรวมของชิ้นเจล ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วถ่ายตัวอย่างใส่หลอด binding column tube นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที นำเฉพาะส่วนกรองใสในหลอด 2 มิลลิลิตรหลอดใหม่ หลังจากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยการล้างสารเคมีออก โดยใส่สาร buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลแอลกอฮอล์ออกจนหมด ขั้นตอนสุดท้ายนำเฉพาะส่วนของคอลัมน์ (binding column tube) ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วละลายดีเอ็นเอด้วยสาร elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำการเก็บเฉพาะดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ปริมาตรสุดท้าย 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 384 bp. จากตัวอย่างเนื้อเยื่อและจากตัวอย่างน้ำและดิน ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen (Korea) และทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้

ด้วยโปรแกรม Chromas LITE จากนั้นนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

3.8 การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology)

นำเนื้อเยื่อจำนวน 10 ตัวอย่าง และตัวอย่างสัตว์ที่พบในฟาร์ม จำนวน 5 ชนิด ที่ตรวจพบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียจากการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แล้วมาแยกเอาเฉพาะส่วนของตับและตับอ่อน เพื่อเก็บรักษาไว้ในน้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อ Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเปลี่ยนในเอทานอลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และนำเนื้อเยื่อมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) โดยแช่ในเอทานอลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 50, 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับความเข้มข้นละ 30 นาที ตามวิธีมาตรฐานของนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ฝังในพาราฟินแล้ว นำมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำไปลอยบนน้ำอุ่น อุณหภูมิประมาณ 35-45 องศาเซลเซียส ใช้กระจกสไลด์ซ้อนแผ่นเนื้อเยื่อแล้วนำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (warmer plate) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงถึงข้ามคืน นำมาวางบนกระจกสไลด์ตรึงตัวอย่างด้วย xylene นาน 5 นาที และแช่สไลด์เนื้อเยื่อในเอทานอลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ ขั้นตอนละ 1 นาทีล้างน้ำและย้อมสี hematoxylin-eosin (H&E) แช่สไลด์เนื้อเยื่อในเอทานอลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 1 นาที แช่ใน xylene อีก 4 นาทีรอให้สไลด์แห้งและปิดทับด้วยยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) โดยใช้น้ำยา permount ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกลักษณะของสปอร์ออกจากเนื้อเยื่อ (Bell et al., 1988)

3.9 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope: TEM)

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกึ่งและสัตว์น้ำที่พบภายในบ่อ โดยใช้ตัวอย่างเดียวกับการทำการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา โดยเลือกเอาเฉพาะตัวอย่างตับและตับอ่อน มาทำการศึกษาโดยใช้การเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ (ศิริเพ็ญ และคณะ, 2535) การเตรียมตัวอย่างเริ่มต้นด้วยการตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดไม่เกิน 0.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แช่ในน้ำยารักษาสภาพ 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer ทิ้งไว้ 2-24 ชั่วโมง ในตู้เย็น หลังจากนั้นล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer 20 นาที 3-4 ครั้ง ใส่ 1 เปอร์เซ็นต์ osmium tetroxide ผสมกับ 0.1 M phosphate buffer ทิ้งไว้ใน hood 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer 20 นาที 1 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น 20 นาที 1 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปดึงน้ำออก ด้วย 35 เปอร์เซ็นต์, 50 เปอร์เซ็นต์, 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลแอลกอฮอล์ ครั้งละ 15-20 นาที แล้วดึงน้ำออก ต่อด้วยเอทานอลแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ครั้งละ 15-20 นาที 3 ครั้ง นำไปแช่ propylene oxide 15-20 นาที 3 ครั้ง แล้วนำไป infiltrate ด้วย spurr resin ผสมกับ propylene oxide อัตราส่วน 1:3, 1:1 และ 3:1 ในอัตราส่วนละ 3-24 ชั่วโมง ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปอบใน

ตู้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นตัดด้วยเครื่องตัด ultramicrotome ให้ได้ section ความหนา 90 นาโนเมตร วางบน copper grid แล้วย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate เพื่อเพิ่ม contrast จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านยี่ห้อ JEOL รุ่น JEM-1400 ประเทศญี่ปุ่น

3.10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์เชิงพรรณนา (descriptive analysis)

- 1) ทำการวิเคราะห์ผลขนาดความยาวของตัวกึ่ง โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variance: %CV) ของข้อมูลจากตัวอย่างกึ่งบ่อเดียวกัน โดยนำค่าเฉลี่ยที่ได้จากข้อมูลความยาวของตัวกึ่งเปรียบเทียบกับผลลัพธ์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) ข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาวกึ่ง และดูความแตกต่างความยาวของตัวกึ่งทุกบ่อในแต่ละฟาร์ม
- 2) ทำการวิเคราะห์น้ำหนักของตัวกึ่ง โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variance: %CV) ของข้อมูลจากตัวอย่างกึ่งบ่อเดียวกัน โดยนำค่าเฉลี่ยที่ได้จากข้อมูลน้ำหนักของกึ่ง เปรียบเทียบกับผลลัพธ์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) ข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักกึ่ง และดูความแตกต่างของน้ำหนักตัวกึ่งทุกบ่อในแต่ละฟาร์ม

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง

4.1.1 ขนาดและน้ำหนักของกึ่งในวันที่ยั่งยืนการเลี้ยง

ทำการวัดขนาดและชั่งน้ำหนักกึ่งในแต่ละบ่อของทุกฟาร์ม จำนวน 100 ตัวต่อบ่อ (Yamane, 1967) เพื่อทำการศึกษาขนาดตัวของกึ่งว่ามีความแตกต่างกันอย่างไรในแต่ละบ่อและบันทึกข้อมูลฟาร์ม (ภาคผนวก ก) โดยศึกษาความเฉลี่ยจากความยาวและน้ำหนักที่วัดได้จากตัวอย่างกึ่งในแต่ละฟาร์มพบว่าค่าเฉลี่ยขนาดความยาวและน้ำหนักจากตัวอย่างกึ่งในฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี ที่ 1 ตัวอย่างกึ่งจากบ่อที่ 1 บ่อที่ 2 และบ่อที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของขนาดความยาว (15.9 ± 0.5 เซนติเมตร, 11.30 ± 0.5 เซนติเมตร และ 12.7 ± 0.5 เซนติเมตร) และค่าเฉลี่ยของน้ำหนักกึ่งในบ่อ (25.50 ± 0.5 กรัม, 10.00 ± 0.5 กรัม และ 12.40 ± 0.5 กรัม) มีค่ามากที่สุดในทุกๆฟาร์ม ซึ่งค่าเฉลี่ยของขนาดความยาวและน้ำหนัก มีค่าน้อยลงในฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี ที่ 2 ตัวอย่างกึ่งจากบ่อที่ 1 บ่อที่ 2 และบ่อที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของขนาดความยาว (12.6 ± 0.8 เซนติเมตร, 11.4 ± 0.6 เซนติเมตร และ 11 ± 0.7 เซนติเมตร) และค่าเฉลี่ยของน้ำหนักกึ่งในบ่อ (9.7 ± 0.8 กรัม, 9.2 ± 0.6 กรัม และ 9.1 ± 0.6 กรัม) ในฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 1 ค่าเฉลี่ยของขนาดความยาวและน้ำหนักของตัวอย่างกึ่งจากบ่อที่ 1 บ่อที่ 2 และบ่อที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของขนาดความยาว (10.0 ± 1.1 เซนติเมตร, 7.8 ± 1.2 เซนติเมตร และ 8.6 ± 1.0 เซนติเมตร) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักกึ่งในบ่อ (8.2 ± 1.0 กรัม, 7.4 ± 1.0 กรัม และ 7.8 ± 1.0 กรัม) และพบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดความยาวและน้ำหนักของฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 2 มีค่าน้อยที่สุด จากตัวอย่างกึ่งจากบ่อที่ 1 บ่อที่ 2 และบ่อที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของขนาดความยาว (6.5 ± 1.4 เซนติเมตร, 7.5 ± 1.6 เซนติเมตร และ 6.5 ± 1.7 เซนติเมตร) และมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักกึ่งในบ่อ (4.0 ± 2.1 กรัม, 4.4 ± 2.0 กรัม และ 4.5 ± 2.0 กรัม) จะเห็นได้ว่าค่าเฉลี่ยของความยาวและน้ำหนักของกึ่งจากฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ 2 มีค่าน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับตัวอย่างกึ่งในฟาร์มจันทบุรี 1 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยความยาวและน้ำหนักมากที่สุด โดยค่าเฉลี่ยที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่คำนวณได้จากการนำค่าเฉลี่ย หารส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation: SD) ของข้อมูล จะได้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของข้อมูลทั้งขนาดความยาว และน้ำหนักของกึ่งในแต่ละบ่อดังตารางที่ 1 จากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่คำนวณได้จะนำมาเปรียบเทียบกับในแต่ละฟาร์มพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาวกึ่งและน้ำหนักในฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี ที่ 1 ตัวอย่างกึ่งจากบ่อที่ 1 บ่อที่ 2 และบ่อที่ 3 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาว ($CV = 3.14$ เปอร์เซ็นต์, 4.42 เปอร์เซ็นต์ และ 3.93 เปอร์เซ็นต์)

และน้ำหนักรูปร่างในบ่อ (CV = 1.96 เปอร์เซ็นต์, 5 เปอร์เซ็นต์ และ 4.03 เปอร์เซ็นต์) มีค่าน้อยที่สุดในทุกๆฟาร์ม ซึ่งค่าความแปรปรวนของขนาดตัวและน้ำหนัก มีค่าสูงขึ้นในฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี ที่ 2 ตัวอย่างกึ่งจากบ่อที่ 1 บ่อที่ 2 และบ่อที่ 3 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาว (CV = 6.34 เปอร์เซ็นต์, 5.26 เปอร์เซ็นต์ และ 6.36 เปอร์เซ็นต์) และน้ำหนักรูปร่างในบ่อ (CV = 8.24 เปอร์เซ็นต์, 5.43 เปอร์เซ็นต์ และ 10.98 เปอร์เซ็นต์) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 1 ตัวอย่างกึ่งจากบ่อที่ 1 บ่อที่ 2 และบ่อที่ 3 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาว (CV = 11 เปอร์เซ็นต์, 15.38 เปอร์เซ็นต์ และ 11.62 เปอร์เซ็นต์) และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักรูปร่างในบ่อ (CV = 12.2 เปอร์เซ็นต์, 13.5 เปอร์เซ็นต์ และ 12.8 เปอร์เซ็นต์) และพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 2 มีค่ามากที่สุด จากตัวอย่างกึ่งจากบ่อที่ 1 บ่อที่ 2 และบ่อที่ 3 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาว (CV = 21.53 เปอร์เซ็นต์, 21.33 เปอร์เซ็นต์ และ 26.15 เปอร์เซ็นต์) และมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักรูปร่างในบ่อ (CV = 52.5 เปอร์เซ็นต์, 45.45 เปอร์เซ็นต์ และ 48.88 เปอร์เซ็นต์) จากภาพที่ 6 จะเห็นได้ว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาวและน้ำหนักรูปร่างจากฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 1 มีค่าน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาวและน้ำหนักรูปร่างจากฟาร์มฉะเชิงเทรา 2 ซึ่งมีค่ามากที่สุด โดยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่งผลให้ตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ 2 ที่พบความแตกต่างของขนาดอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกึ่งในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี ที่ 1 ที่กึ่งมีขนาดไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยและสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของความยาวและน้ำหนักของตัวกุ้งระยะเต็มวัย(n=100)

แหล่งตัวอย่าง	บ่อ (อายุ)	ความยาว (ซม.)		น้ำหนัก (กรัม)	
		ค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบน	สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน	ค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบน	สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน
ฉะเชิงเทรา 1	1 (48วัน)	10.0±1.1 ^d	11	8.2±1.0 ^c	12.2
	2 (48วัน)	7.8±1.2 ^b	15.38	7.4±1.0 ^b	13.5
	3 (48วัน)	8.6±1.0 ^c	11.62	7.8±1.0 ^{bc}	12.8
	1 (50วัน)	6.50±1.4 ^a	21.53	4.00±2.1 ^a	52.5
	2 (50วัน)	7.50±1.6 ^b	21.33	4.40±2.0 ^a	45.45
	3 (50วัน)	6.50±1.7 ^a	26.15	4.50±2.2 ^a	48.88
จันทบุรี 1	1 (60วัน)	15.90±0.5 ^g	3.14	25.50±0.5 ^h	1.96
	2 (50วัน)	11.30±0.5 ^e	4.42	10.00±0.5 ^f	5
	3 (50วัน)	12.70±0.5 ^f	3.93	12.40±0.5 ^g	4.03
จันทบุรี 2	1 (50วัน)	12.6±0.8 ^f	6.34	9.7±0.8 ^{ef}	8.24
	2 (50วัน)	11.4±0.6 ^e	5.26	9.2±0.6 ^{de}	5.43
	3 (50วัน)	11.5±0.7 ^e	6.36	9.1±0.6 ^d	10.98

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



ภาพที่ 6 ความแตกต่างของขนาดกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อเดียวกันและตรวจพบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1 ที่กุ้งมีขนาดไม่แตกต่างกัน (A) เปรียบเทียบกับฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2 ที่แสดงถึงความแตกต่างของขนาดที่ชัดเจน (B)

4.1.2 ชนิดสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบ

ชนิดสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบนอกจากกุ้งขาวที่จับได้จากในบ่อกุ้งเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง จากฟาร์ม ทั้ง 4 ฟาร์มที่ทำการศึกษา โดยทำการเก็บสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในบ่อกุ้งฟาร์มละ 5 ชนิด ชนิดละ 10 ตัว เนื่องจากมีการระบาดของโรคในฟาร์มกุ้งที่ทำการศึกษา จึงมีข้อจำกัดในการเข้าไปเก็บตัวอย่าง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ในบ่อกุ้ง ทำให้สามารถจับสัตว์น้ำขนาดใหญ่ได้ ดังนี้

- 1) สัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบภายในบ่อเลี้ยงกุ้งของจังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 1 คือ ปูนา (*Sayamia bangkokensis*), ปลากินยุง (*Gambusia holbrooki*), กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*), หอยโข่ง (*Pila ampullacea*) และ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (ภาพที่ 7)
- 2) สัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบภายในบ่อเลี้ยงกุ้งของจังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2 คือ ปูนา กุ้งก้ามกราม, ปลากินยุง, ปลาบู๋ไฮ (*Gobioterus chuno*) และปลานิล (ภาพที่ 8)
- 3) สัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบภายในบ่อเลี้ยงกุ้งของจังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1 คือ ปูแสม ก้ามม่วง (*Episesarma versicolor*), ปลาบู๋ (*Mugilogobius platynotus*), ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*), หอยถ่าน (*Fanus ater*) และปูแป้น (*Varuna litterata*) (ภาพที่ 9)
- 4) พบสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบภายในบ่อเลี้ยงกุ้งของจังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 2 คือ ปูแสมก้ามแดง (*Episesarma mederi*), ปลาบู๋, ปลาตุ๊กแตนหิน (*Blenniidae* sp.), ปูแป้น และหอยขี้กา (*Telescopium telescopium*) (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 7 ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 1 A. ปูนา, B. กุ้งก้ามกราม, C. ปลาकिनยุง, D.: หอยโข่ง และ E.: ปลานิล



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 8 ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2 A. ปูนา, B. กุ้งก้ามกราม, C. ปลาकिनยุง, D. ปลาบูไซ และ E. ปลานิล



ภาพที่ 9 ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1 A. ปู
 แสมก้ามม่วง, B. ปลาบู่, .C. ปลาหมอเทศ, D. หอยถ่าน และ E. ปูแป้น



ภาพที่ 10 ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวจังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 2 A. ปูแสม ก้ามแดง, B. ปลาบู่, C. ปลาดุกแตงหิน, D. หอยขี้กา และ E. ปูแป้น

4.1.3 ลักษณะน้ำและดิน

น้ำและดินที่ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละฟาร์มพบว่า ลักษณะน้ำในทุกบ่อที่ทำการเก็บตัวอย่าง มีสีน้ำตาล และขุ่นในวันที่เริ่มเลี้ยง โดยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงพบว่า น้ำมีตะกอนเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการเลี้ยงและให้อาหารกุ้ง (ตารางที่ 2) (ภาพที่ 11) โดยดินก่อนปล่อยกุ้งมีลักษณะแตกต่างกันในแต่ละฟาร์ม แต่หลังจากการปล่อยกุ้งพบว่าฟาร์มจากจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 และ 2 มีลักษณะที่คล้ายกัน คือ ดินกลายเป็นดินเลนสีดำ มีพื้นบ่อไม่แน่น และฟาร์มจากจังหวัดจันทบุรีมีลักษณะที่คล้ายกัน คือ ดินมีสีที่เข้มขึ้นแต่ดินพื้นบ่อยังมีลักษณะแน่น (ตารางที่ 3) (ภาพที่ 12) คุณภาพน้ำในแต่ละฟาร์มใน(ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 2 ลักษณะของน้ำในบ่อตัวอย่าง

ฟาร์ม	วันที่เริ่มเลี้ยง	วันที่สิ้นสุดการเลี้ยง
ฉะเชิงเทรา 1	สีน้ำตาลอ่อนและใส	สีน้ำตาล ขุ่น
ฉะเชิงเทรา 2	สีน้ำตาลเข้มและขุ่น	สีน้ำตาลเข้ม ขุ่น และมีตะกอนมาก
จันทบุรี 1	สีเขียวจางและใส	สีน้ำตาลเข้ม ขุ่น
จันทบุรี 2	สีน้ำตาลปนเขียวและใส	สีน้ำตาลปนเขียว ขุ่น

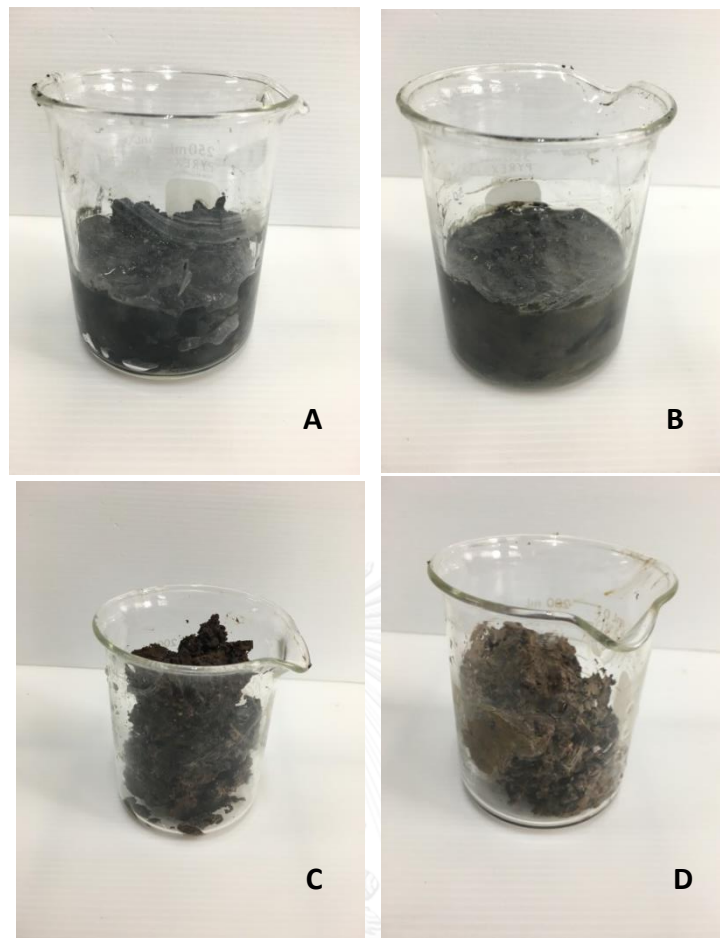
ตารางที่ 3 ลักษณะของดินในบ่อตัวอย่าง

ฟาร์ม	วันที่เริ่มเลี้ยง	วันที่สิ้นสุดการเลี้ยง
ฉะเชิงเทรา 1	สีน้ำตาลเข้ม ไม่อัดแน่น	เลนสีดำ มีกลิ่นไฮโดรเจนซัลไฟด์ และพื้นบ่อไม่แน่น
ฉะเชิงเทรา 2	สีน้ำตาลเข้ม เหลวอุ้มน้ำ	เลนสีดำ มีกลิ่นไฮโดรเจนซัลไฟด์ และพื้นบ่อไม่แน่น
จันทบุรี 1	สีน้ำตาล อัดแน่น	เลนสีน้ำตาล ไม่มีกลิ่น ดินพื้นบ่อแน่น
จันทบุรี 2	ดินแข็ง และเป็นลูกรัง	เลนสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีกลิ่น ดินพื้นบ่อแน่น และพบก้อนหินลูกรัง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 11 แสดงตัวอย่างน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว A : จังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 1, B : จังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2, C : จังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1, D : จังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 2



ภาพที่ 12 แสดงตัวอย่างดินในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว A : จังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 1, B : จังหวัดฉะเชิงเทรา ฟาร์มที่ 2, C : จังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 1, D : จังหวัดจันทบุรี ฟาร์มที่ 2

4.2 การศึกษาทางอนุชีววิทยา

จากการศึกษาด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในตัวอย่างกุ้งขาว สัตว์น้ำขนาดใหญ่ น้ำ และดิน จากฟาร์มต่าง ๆ ได้ผลการตรวจ ดังแสดงตารางที่ 4-7 และภาคผนวก ค แสดงภาพการปรากฏของ แอบตีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในภาคผนวก ง

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรส จากตัวอย่างของฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1

ตัวอย่าง	บ่อที่ 1				บ่อที่ 2				บ่อที่ 3			
	ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง		ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง		ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
กุ้งขาวเลี้ยง	8	2	8	2	0	10	8	2	0	10	6	4
ปูนา	0	0	2	8	0	0	3	7	0	0	2	8
กุ้งก้ามกราม	0	0	1	9	0	0	2	8	0	0	1	9
ปลาकिनยุง	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
หอยโข่ง	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
ปลานิล	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
ดิน	0	5	2	3	1	4	3	2	1	4	2	3
น้ำ	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

+ พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ; - ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ

ฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 ตรวจพบเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรส จากตัวอย่างกุ้งขาวในบ่อที่ 1 ก่อนการเลี้ยงจำนวน 8 จาก 10 ตัวอย่าง และหลังการเลี้ยงจำนวน 8 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูนา จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม จำนวน 1 จาก 10 ตัวอย่าง และตรวจพบในดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 2 จาก 5 ตัวอย่าง บ่อที่ 2 ตรวจไม่พบเชื้อจากตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง แต่พบเชื้อหลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงจำนวน 8 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูนา จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง และพบเชื้อในดินก่อนการเลี้ยงจำนวน 1 จาก 5 ตัวอย่าง หลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 2 จาก 5 ตัวอย่าง บ่อที่ 3 ตรวจไม่พบเชื้อจากตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง แต่พบเชื้อหลังจากสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 6 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูนา จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม จำนวน 1 จาก 10 ตัวอย่าง และพบเชื้อในดินก่อนการเลี้ยงจำนวน 1 จาก 5 ตัวอย่าง หลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 2 จาก 5 ตัวอย่าง โดยทั้ง 3 บ่อ ตรวจไม่พบการติดเชื้อในตัวอย่างปลาकिनยุง ปลานิล และตัวอย่างน้ำทั้งก่อนการเลี้ยงและหลังสิ้นสุดการเลี้ยงกุ้งขาว

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา

ลูกโซ่โพลีเมอเรสจากตัวอย่างของฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2

ตัวอย่าง	บ่อที่ 1				บ่อที่ 2				บ่อที่ 3			
	ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง		ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง		ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
กุ้งขาวเลี้ยง	8	2	8	2	5	5	7	3	6	4	8	2
ปูนา	0	0	3	7	0	10	2	8	0	0	3	7
กุ้งก้ามกราม	0	0	1	9	0	10	2	8	0	0	2	8
ปลากินยุง	0	0	0	10	0	10	0	10	0	0	0	10
ปลาบู่ใส	0	0	0	10	0	10	0	10	0	0	0	10
ปลานิล	0	0	0	10	0	10	0	10	0	0	0	10
ดิน	2	3	3	2	1	4	2	3	1	4	3	2
น้ำ	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

+ พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ; - ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ

ฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ตรวจพบเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากตัวอย่างกุ้งขาวในบ่อที่ 1 ก่อนการเลี้ยงจำนวน 8 จาก 10 ตัวอย่าง และหลังการเลี้ยงจำนวน 8 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูนา จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม จำนวน 1 จาก 10 ตัวอย่าง และตรวจพบในดินก่อนการเลี้ยง จำนวน 2 จาก 5 ตัวอย่าง หลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 3 จาก 5 ตัวอย่าง บ่อที่ 2 ตรวจพบเชื้อจากตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยงจำนวน 5 จาก 10 ตัวอย่าง หลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 7 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูนา จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง และพบเชื้อในดินก่อนการเลี้ยงจำนวน 1 จาก 5 ตัวอย่าง หลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 2 จาก 5 ตัวอย่าง บ่อที่ 3 ตรวจพบเชื้อจากตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง จำนวน 6 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อหลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 8 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูนา จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง และพบเชื้อในดินก่อนการเลี้ยงจำนวน 1 จาก 5 ตัวอย่าง หลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 3 จาก 5 ตัวอย่าง โดยทั้ง 3 บ่อ ตรวจไม่พบการติดเชื้อในตัวอย่างปลากินยุง ปลาบู่ใส ปลานิล และตัวอย่างน้ำทั้งก่อนการเลี้ยงและหลังสิ้นสุดการเลี้ยงกุ้งขาว

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา
ลูกโซ่โพลีเมอเรสจากตัวอย่างของฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1

ตัวอย่าง	บ่อที่ 1				บ่อที่ 2				บ่อที่ 3			
	ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง		ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง		ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
กุ้งขาว	0	10	3	7	0	10	3	7	0	10	2	8
ปูแสมก้ามม่วง	0	0	2	8	0	0	3	7	0	0	2	8
ปลาบู่	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
ปลาหมอเทศ	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
หอยถ่าน	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
ปูแป้น	0	0	1	9	0	0	1	9	0	0	1	9
ดิน	0	5	1	4	0	5	3	2	0	5	2	3
น้ำ	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

+ พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ; - ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ

ฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1 ตรวจพบเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา
ลูกโซ่โพลีเมอเรส จากตัวอย่างกุ้งขาวในบ่อที่ 1 หลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง แต่ไม่
พบเชื้อก่อนการเลี้ยง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูแสมก้ามม่วง จำนวน 2 จาก 10
ตัวอย่าง ปูแป้น จำนวน 1 จาก 10 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบในดินก่อนการเลี้ยง แต่ตรวจพบเชื้อหลัง
สิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 1 จาก 5 ตัวอย่าง บ่อที่ 2 ตรวจไม่พบเชื้อจากตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง แต่
ตรวจพบเชื้อหลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ
ปูแสมก้ามม่วง จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง ปูแป้น จำนวน 1 จาก 10 ตัวอย่าง และพบเชื้อในดินหลัง
สิ้นสุดการเลี้ยงจำนวน 3 จาก 5 ตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อในดินก่อนการเลี้ยง บ่อที่ 3 ตรวจไม่พบเชื้อ
จากตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง แต่พบเชื้อหลังจากสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อ
ในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูแสมก้ามม่วง จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง ปูแป้น จำนวน 1 จาก
10 ตัวอย่าง และพบเชื้อในดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 2 จาก 5 ตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อในดินก่อน
การเลี้ยง โดยทั้ง 3 บ่อ ตรวจไม่พบการติดเชื้อในตัวอย่างปลาบู่ ปลาหมอเทศ หอยถ่าน และตัวอย่าง
น้ำทั้งก่อนการเลี้ยงและหลังสิ้นสุดการเลี้ยงกุ้งขาว

ตารางที่ 7 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากตัวอย่างของฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2

ตัวอย่าง	บ่อที่ 1		บ่อที่ 2		บ่อที่ 3							
	ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง		ก่อนเลี้ยง		หลังเลี้ยง					
	+	-	+	-	+	-	+	-				
กุ้งขาว	0	10	4	6	0	10	6	4	0	10	4	6
ปูแสมก้ามแดง	0	0	2	8	0	0	3	7	0	0	2	8
ปลาบู่	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
ปลาตึกแตนนหิน	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
ปูแป้น	0	0	2	8	0	0	3	7	0	0	3	7
หอยขี้กา	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10
ดิน	0	5	2	3	0	5	2	3	0	5	3	2
น้ำ	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5

+ พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ; - ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ

ฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2 ตรวจพบเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส จากตัวอย่างกุ้งขาวในบ่อที่ 1 หลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 4 จาก 10 ตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อก่อนการเลี้ยง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูแสมก้ามแดง จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง ปูแป้น จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบในดินก่อนการเลี้ยง แต่ตรวจพบเชื้อหลัง สิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 2 จาก 5 ตัวอย่าง บ่อที่ 2 ตรวจไม่พบเชื้อจากตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง แต่ ตรวจพบเชื้อหลังจากสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 6 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูแสมก้ามแดง จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง ปูแป้น จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง และพบเชื้อในดิน หลังสิ้นสุดการเลี้ยงจำนวน 2 จาก 5 ตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อในดินก่อนการเลี้ยง บ่อที่ 3 ตรวจไม่พบ เชื้อจากตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง แต่พบเชื้อหลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 4 จาก 10 ตัวอย่าง พบเชื้อ ในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ 2 ชนิด คือ ปูแสมก้ามแดง จำนวน 2 จาก 10 ตัวอย่าง ปูแป้น จำนวน 3 จาก 10 ตัวอย่าง และพบเชื้อในดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง จำนวน 3 จาก 5 ตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อในดินก่อน การเลี้ยง โดยทั้ง 3 บ่อ ตรวจไม่พบการติดเชื้อในตัวอย่างปลาบู่ ปลาตึกแตนนหิน หอยขี้กา และ ตัวอย่างน้ำทั้งก่อนการเลี้ยงและหลังสิ้นสุดการเลี้ยงกุ้งขาว

จากผลการตรวจสอบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่ทำการศึกษาในตัวอย่างกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ ดินและน้ำ พบว่า

ฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 1 บ่อที่ 1 ตรวจพบเชื้อในตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวาในวันแรกที่เริ่มเลี้ยง และสามารถพบเชื้อได้จนถึงวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงสำหรับบ่อที่ 2 และ บ่อที่ 3 ไม่พบเชื้อในตัวอย่างลูกกุ้งในวันที่เริ่มเลี้ยง แต่พบเชื้อในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง ซึ่งทั้งบ่อที่ 1, 2 และ 3 ของฟาร์มนี้ พบเชื้อในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง ในตัวอย่างกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ ได้แก่ ปูนา (*S. bangkokensis*) กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) รวมไปถึงตัวอย่างและดิน แต่ไม่พบเชื้อในปลากินยุง (*G. holbrooki*), หอยโข่ง (*Pila ampullacea*) และ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

ฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ 2 พบเชื้อในตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวา และตัวอย่างดินทุกบ่อ ในวันที่เริ่มเลี้ยง และสามารถพบเชื้อได้จนถึงวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงทั้งในตัวอย่างกุ้งและดินสำหรับสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่หลุดลอดเข้ามาในบ่อกุ้งและพบเชื้อ ก็คือ ปูนา และกุ้งก้ามกราม ในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง แต่ไม่พบการติดเชื้อในปลากินยุง, ปลาบู่ใส (*G. chuno*) และปลานิล

ฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 1 และ 2 ไม่พบเชื้อในตัวอย่างกุ้งและดินทุกบ่อในวันแรกเริ่มเลี้ยง แต่ในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง พบเชื้อในตัวอย่างกุ้ง และสัตว์น้ำขนาดใหญ่ในฟาร์มจันทบุรีที่ 1 ที่หลุดลอดเข้ามาในบ่อ 2 ชนิดคือ ปูแสมก้ามม่วง (*E. versicolor*) และปูแป้น (*V. litterata*) แต่ไม่พบการติดเชื้อในปลาบู่ (*M. platynotus*), ปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*), หอยถ่าน (*Faunus ater*) สำหรับสัตว์น้ำขนาดใหญ่ในฟาร์มจันทบุรี ที่ 2 ที่หลุดลอดเข้ามาในบ่อและพบเชื้อคือ ปูแสมก้ามแดง (*E. mederi*) และปูแป้น (*V. litterata*) และดินในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง แต่ไม่พบการติดเชื้อในปลาบู่, ปลาตึกแตงหิน (*Blenniidae* sp.) และหอยขี้กา (*T. telescopium*) นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อได้ในตัวอย่างดินจากฟาร์มทั้งสองของจังหวัดนี้ในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง

4.3 การตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ที่ขนาด 384 bp. โดยนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ได้ผลดังตารางที่ 8-21

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 294 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลามาของฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2

```
CAAAAAAGTTCAATGGGTTGGATGCTGCAGTTAAAGGGTCCGTAGTCGTAGATGCA
ATTTAAAGGTGGTGTAAAAGCCATTGAGTTTGTGAGAGTAGCGGAACGGATAGG
GAGCATGGTATAGGTGGGCAAAGAATGAAATCTCAAGACCCACCTGGACCAACGG
AGGCGAAAGCGATGCTCTTAGACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGGCTAGAGTAT
CGAAAGTGATTAGACACCGCTGTAGTTCTAGCAGTAAACTATGCCGACAATGCTGGG
TGTTGCGAGAGA
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 294 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลามา ในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลามา มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์ยูนิโตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 357 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งระยะโตเต็มวัยจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2

```
GGGAGGTA CTTGACGTGAGCATTGGAGGGCAAGTTTTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATTCCAAC TCCAAGAGTGTCTATGGTGGATGCTGCAGTTAAAGGGTCCGTAGTCGTA
GATGCAAT TAAAAGGTGGTGTAAAAGCCATTGAGTTTGTGAGAGTAGCGGAACG
GATAGGGAG CATGGTATAGGTGGGCAAAGAATGAAATCTCAAGACCCACCTGGAC
CAACGGAG GCGAAAGCGATGCTCTTAGACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGGCTA
GAGTATCG AAAGTGATTAGACACCGCTGTAGTTCTAGCAGTAAACTATGCCGACAAT
GCTGGGTT TTTGCGAGAGAA
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 357 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างกุ้งระยะโตเต็มวัยในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของตัวอย่างกุ้งระยะโตเต็มวัย มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์ยูนิตรไโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 99เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 286 คู่เบสจากตัวอย่างปูนาจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1

TCGTCCTTGATCCCCAGATACGTCTAAGAGCATCGCTTTCGCCTCCGTTGGTCCAGG
 TGGGGTCTTGAGATTTCAATTCTTTGCCACCTATACCATGCTCCCTATCCGTTCCGCT
 ACTCTCAACAACTCAATGGCTTTTAAACACCACCTTTTAATTGCATCTACGACTACG
 GACCCTTTAACTGCAGCATCCACCATAGACACTCTTGGAGTTGGAATTACCGCGGCT
 GCTGGCACCAAACTTGCCCTCCAATTGCTTCACGTCAAGGTTTTTACACTCGACCC

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 286 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างปูนาในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของตัวอย่างปูนา มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์ยูนิตรไโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 100เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 229 คู่เบสจากตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 1

AAATGCTAGACTACAGCGGTGTCTAATCACTTTTCGATACTCTAGCCTTCGTCCTTGA
 TCCCCAGATACGTCTAAGAGCATCGCTTTCGCCTCCGTTGGTCCAGGTGGGGTCTTG
 AGATTTCAATTCTTTGCCACCTATACCATGCTCCCTATCCGTTCCGCTACTCTCAACA
 AACTCAATGGCTTTTAAACACCACCTTTTAATTGCATCTACGACTACGGACCCTTTAA

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 229 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างกุ้งก้ามกรามในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของตัวอย่างกุ้งก้ามกราม มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์ยูนิตรไโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 99เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 282 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปูนาจากฟาร์มจังหวัด ฉะเชิงเทรา 2

```
AATCCAACCTCCAAGAGTGTCTATGGTGGATGCTGCAGTTAAAGGGTCCGTAGTCGT
AGATGCAATTAAGGTGGTGTAAAAGCCATTGAGTTTGTGAGAGTAGCGGAAC
GGATAGGGAGCATGGTATAGGTGGGCAAAGAATGAAATCTCAAGACCCACCTGGA
CCAACGGAGGCGAAAGCGATGCTCTTAGACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGGCT
AGAGTATCGAAAGTGATTAGACACCGCTGTAGTTCTAGCATTAACTATGCCGACAA
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 282 คู่เบส ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาก ตัวอย่างปูนาในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของตัวอย่างปูนา มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์บูยูนิต โรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 171 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากฟาร์มในจังหวัด ฉะเชิงเทรา 2

```
AGGCAGAAATACTGCTAAACTACAGCGGTGTCTAATCACTTTTCGATACTCTAGCCTT
CGTCCTTGATCCCCAGATACGTGAAGGGCATCGCTTTCGCCTCCGTTGGTCCAGGTG
GGGTCTTGAGATTTCAATCTTTGCCACCTATACCATGCTCCCTATCCGTTCCGCTA
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างกุ้ง ก้ามกรามในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็น ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของตัวอย่างกุ้งก้ามกราม มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์บูยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 98 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 228 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปูแสมก้ามม่วงจากฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี 1

```
TTCGTCCTTGATCCCCAGATACGTCTAAGAGCATCGCTTTCGCCTCCGTTGGTCCAG
GTGGGGTCTTGAGATTTCAATCTTTGCCACCTATACCATGCTCCCTATCCGTTCCG
CTACTCTCAACAACTCAATGGCTTTTAACACCACCTTTTAATTGCATCTACGACTA
CGGACCCTTTAACTGTGGCATCCACCATAGACACTCTTGGAGTTGGAATTACCGCGG
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 228 คู่เบสของผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์จากตัวอย่างปูแสมก้ามม่วงในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 1 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปูแสมก้ามม่วง มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอ

ไทรนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัพยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 171 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปูแป้นจากฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 1

```
CTTGAAAAAAGAATTCTTTGCCACCTATACCATGCTCCCTATCCGTTCCGCTACT
CTCAACAACTCAATGGCTTTAACACCACCTTTTAATTGCAGCTACGACTACGGAC
CCTTTAACTGCAGCATCCACCATAGACACTCTTGGAGGTGGAATTACCGAGGATGCT
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 171 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างปูแป้นในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 1 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปูแป้น มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัพยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 98 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 290 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปูแสมก้ามแดงจากฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 2

```
CACCCAGTTCGATGGTGGATGCTGCAGTTAAGGGTCCGTAGTCGTAGATGCAATTA
AAAGGTGGTGTAAAACCCTTTGAGTTTGTGAGAGTAGCGGAACGGATAGGGAGC
ATGGTATAGGTGGGCAAAGAATGAAATCTCAAGACCCACCTGGACCAACGGAGGC
GAAAGCGATGCTCTTAGACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGGCTAGAGTATCGAA
AGTGATTAGACACCGCTGTAGTTCTAGCAGTAACTATGCCGACAATGCTGGGTGTT
GCGAGAGA
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 290 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างปูแสมก้ามแดงในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 2 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปูแสมก้ามแดง มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัพยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 98 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างปูแป้นจากฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 2

```
ACACCAAATCGATGGTGGATGCTGCAGTTAAGGGTCCGTAGTCGTAGATGCAATTA
AAGGTGGTGTAAAACCATTGAGTTTGTGAGAGTAGCGGAACGGATAGGGAGCA
TGGTATAGGTGGGCAAAGAATGAAATCTCAAGACCCACCTGGACCAACGGAGGCG
AAAGCGATGCTCTTAGACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGGCTAGAGTATCGAAA
```

GTGATTAGACACCGCTGTAGTTCTAGCAGTAACTATGCCGACAATGCTGGGTGTTG
CGAGAGA

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างปูแป้นในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 2 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างปูแป้น มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัปปูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างดินจากฟาร์มจังหวัด
ฉะเชิงเทรา 1

AGAGGTAGCTTGCAGAGAGCTTATGAACGTGAGTAGAAGGGTCGTGCTGGGTGTT
GCGATACAACCTCCGAAAGTGTCTATGGTGGATGCTGCAGTTAAAGGGTCCGTAGTC
GTAGATGCAATTAAGGTGGTGTAAAAGCCATTGAGTTTGTGAGAGTAGCGGA
ACGGATAGGGAGCATGGTATAGGTGGCAAAGAATGAAATCTCAAGACCCACCTG
GACCAACGGAGGCGAAAGCGATGCTCTTAGACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGG
CTAGAGTATCGAAAGTGATTAGACACCGCTGTAGTTCTAGCAGTAACTATGCCGAC
AATGCTGGGTGTTGCGAGAGA

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาก
ตัวอย่างดินในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็น
ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดิน มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัปปูนิตไรโบโซ
มอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างดินจากฟาร์มจังหวัด
ฉะเชิงเทรา 2

TTCCACGGGTGAGTAACCCGTGGGAATCTACCTAGTTCTACGGAACAACAGTTGGAA
ACGACTGCTAATACCGTATACGCCCTATGGGGGAAAGATTTATCGGAATTAAATGAG
CCGCGTAAGATTACCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCCACGATCTTTAG
CTGGTCTGAGGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 289 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาก
ตัวอย่างดินในฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็น

ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดิน มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์บยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 98 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 262 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างดินจากฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 1

```
TTATGAACGTGAGTAGAAGGGTCGTGCTGGCTGTTGCTAGTCCGCCTCCGAGACTGT
CTATGGTGGATGCTGCCGTTTAAGGGTCCGTAGTCGTACATGCAATTAAGGTGGT
GTTAAAACCATTTGAGTTTGTGAGAGTACCGGAACGGATAGGGAGCATGGTATAG
GTGGGCAAAGAATGAAATCTCAAGACCCACCTGGACCAACGGAGGCGAAAGCAAT
GCTCTTAAACGTATCTGGGGATCAAGGACGAAGGCT
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 262 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างดินในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 1 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดิน มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์บยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 98 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 292 คู่เบสที่ได้จากตัวอย่างดินจากฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 2

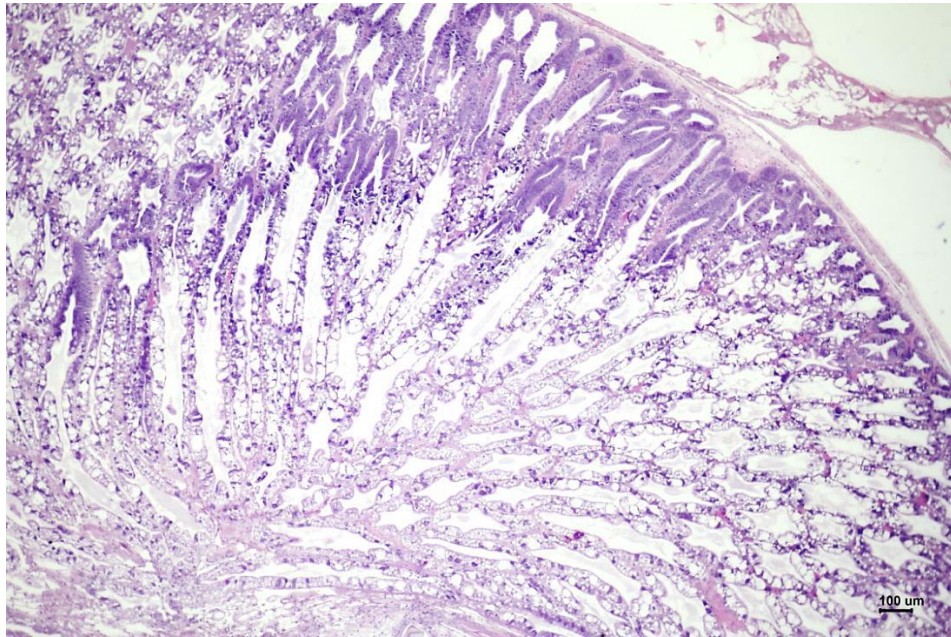
```
GGCAATTTTTATGGCAAGACTACAGCGGTGTCTAATCACTTTCGGATACTCTAGCCT
TCGTCCTTGATCCCCAGATACGTCTAAGAGCATCGCTTTCGCCTCCGTTGGTCCAGG
TGGGGTCTTGAGATTTTATTCTTTGCCACCTATACCATGCTCCCTATCCGTTCCGCT
ACTCTCAACAACTCAATGGCTTTTAAACACCACCTTTAATTGCATCTACGACTACG
GACCCTTTAACTGCAGCATCCACCATAGACACTCTTGGAGTTGGAATTACCGCGGCT
GCTGGC
```

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ความยาว 292 คู่เบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างดินในฟาร์มจังหวัดจันทบุรี 2 กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดิน มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซ์บยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *E. hepatopenaei* (Genbank No.KX013492.1) 99 เปอร์เซ็นต์

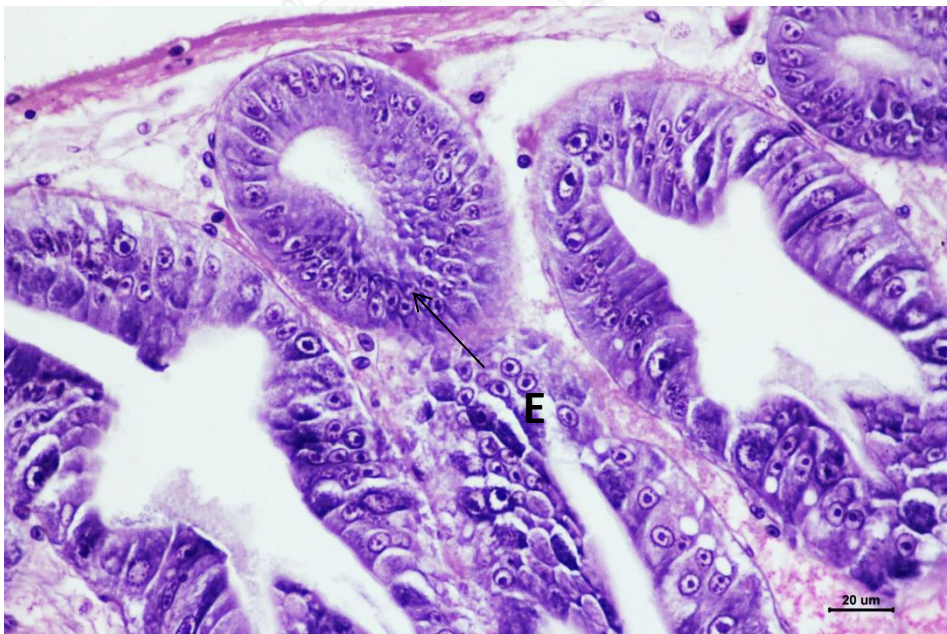
4.4 การแปลผลทางลักษณะจุลพยาธิวิทยา

4.4.1 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในตัวอย่างกึ่ง

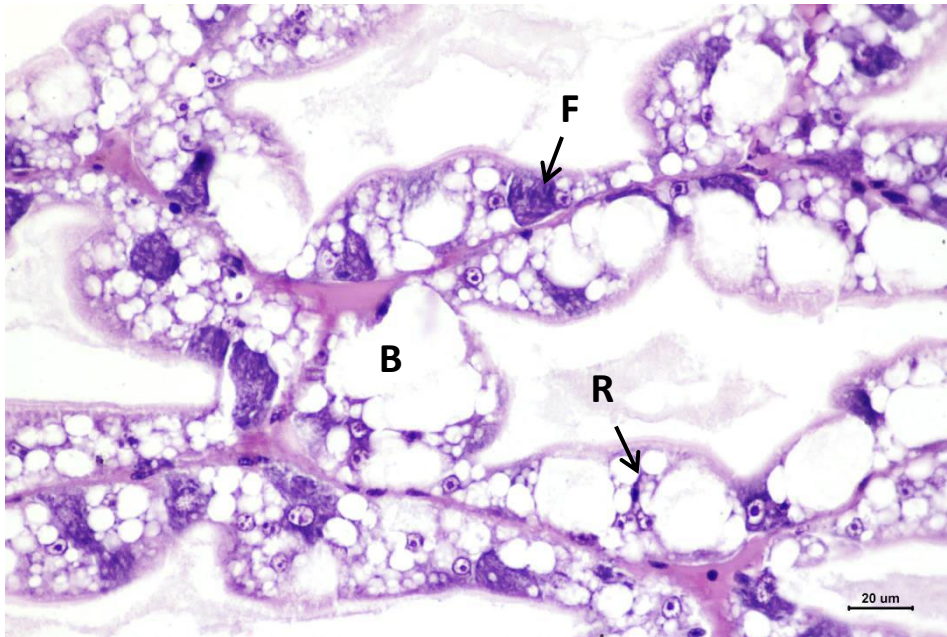
ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา ด้วยการย้อมสี hematoxylin-eosin ในเนื้อเยื่อตับ โดยตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยวิธีพีซีอาร์จะพบว่า ลักษณะของเนื้อเยื่อเซลล์ตับระดับอ่อนของกึ่งยังมีลักษณะที่ปกติ มีการสะสมของเม็ดไขมัน รอบๆท่อทางเดินตับและตับอ่อน ผนังและโครงสร้างของท่อตับและตับอ่อนมีโครงสร้างปกติ ไม่พบผนังท่อตับและตับอ่อนถูกทำลายหรือลักษณะโครงสร้างคล้ายกับกลุ่มสปอร์ (microsporidian -like) ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ยังคงพบเซลล์ผลิตแอนติบอดีที่อยู่โดยรอบท่อตับและตับอ่อน เช่น Blister-like cell (B-cell), Resorption cell (R-cell), Embryonic cell (E-cell) และ Fibrillar cell (F-cell) (ภาพที่ 13-15) ซึ่งพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาจากตัวอย่างกึ่งที่ตรวจพบเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยวิธีพีซีอาร์ในแต่ละฟาร์มจะพบลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* แทรกอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อน พบลักษณะการติดสีน้ำเงินเข้ม (basophilic) แทรกตัวอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ การตอบสนองต่อร่างกายของกึ่งที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมีลักษณะความรุนแรงที่ต่างกัน ในฟาร์มจันทบุรี ที่ 1 พบการตอบสนองของร่างกายกึ่งต่อเชื้อไม่มากจึงสามารถพบโครงสร้างของท่อทางเดินตับและตับอ่อนคงรูปร่างอยู่ตามปกติ (ภาพที่ 16) เมื่อย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin เพียงแต่พบลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มฉะเชิงเทรา 1 และจันทบุรี 2 พบลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* แทรกอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อน (ภาพที่ 17-19) ลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ในท่อตับและตับอ่อน เริ่มมีการอักเสบของผนังท่อตับและตับอ่อนได้โดยพบว่า นิวเคลียสของเซลล์รอบๆท่อตับและตับอ่อนมีการขยายตัวมากขึ้น (hypertrophic nuclei) มากกว่าตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มจันทบุรี 2 (ภาพที่ 20) ตัวอย่างของกึ่งในฟาร์มฉะเชิงเทรา ที่ 2 พบลักษณะการตอบสนองของร่างกายกึ่งมากขึ้นกว่าทุกฟาร์มคือพบ ลักษณะเซลล์ตับและตับอ่อนถูกทำลาย (degeneration hepatopancreatic epithelial cell) ร่วมกับการลอกหลุดของผนังท่อตับและตับอ่อน ซึ่งพบลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* แทรกอยู่ในเซลล์ท่อตับและตับอ่อน มีเม็ดเลือดเข้ามาแทรกที่ช่องว่างของตับและตับอ่อนมากขึ้นในตัวอย่างกึ่งที่มีการตอบสนองต่อเชื้ออย่างรุนแรง และการตอบสนองของร่างกายกึ่งเมื่อที่ตับและตับอ่อนถูกทำลายร่วมกับการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย จะพบเม็ดเลือดจำนวนมากแทรกตัวภายในช่องว่างระหว่างท่อตับและตับอ่อน (hemocytic infiltration)



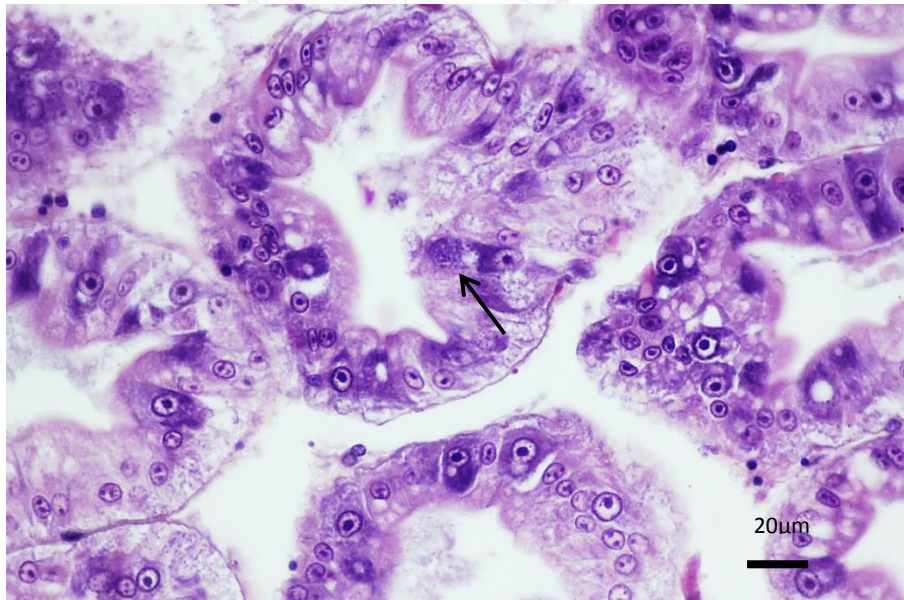
ภาพที่ 13 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างกึ่งที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E.hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติจากตัวอย่างกึ่งฟาร์มจังหวัดจันทบุรีที่ 1 ที่กำลังขยาย 40 เท่า



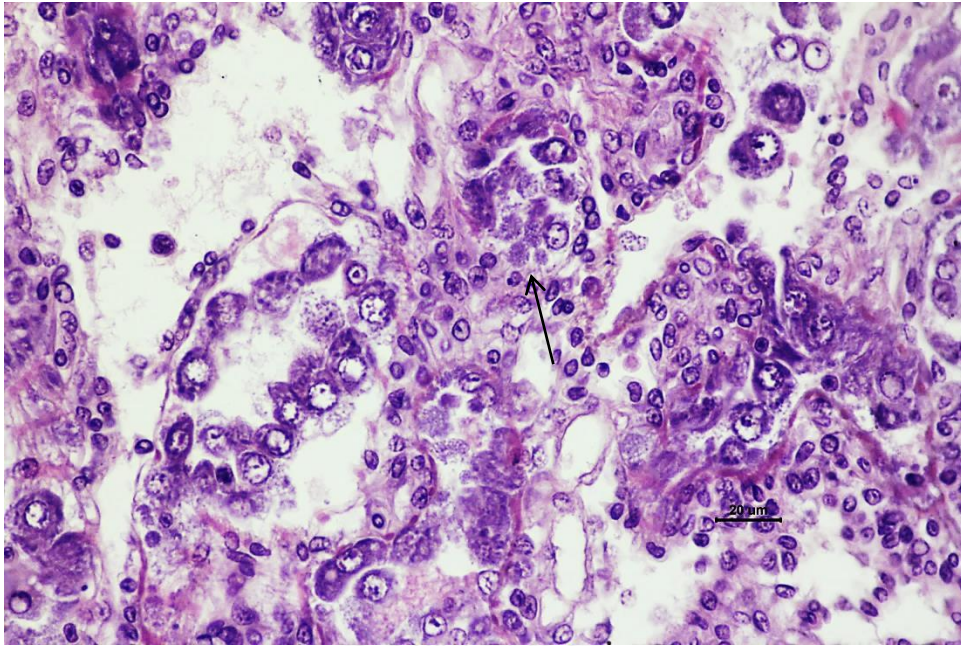
ภาพที่ 14 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างกึ่งที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E. hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติพบ E: e-cell (ลูกศรชี้) ภายในท่อตับและตับอ่อนของตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 1 ที่กำลังขยาย 400 เท่า



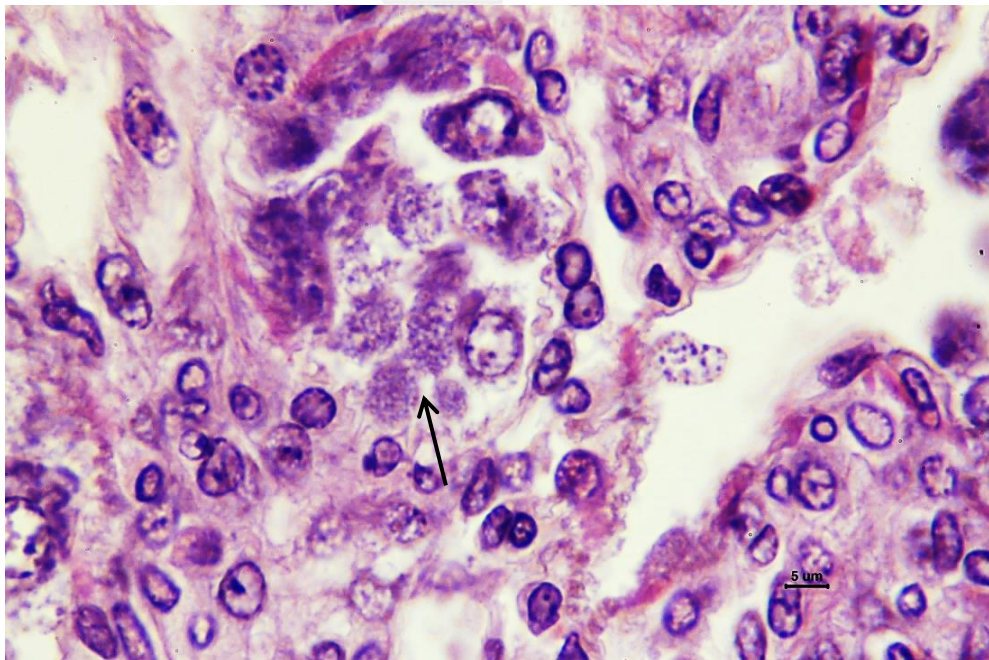
ภาพที่ 15 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างกุ้งที่ตรวจไม่พบเชื้อ *E.hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติพบ B: B-cell, R: R-cell และ F:F cell(ลูกศรชี้)ภายในท่อตับและตับอ่อนของตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 1 ที่กำลังขยาย 400 เท่า



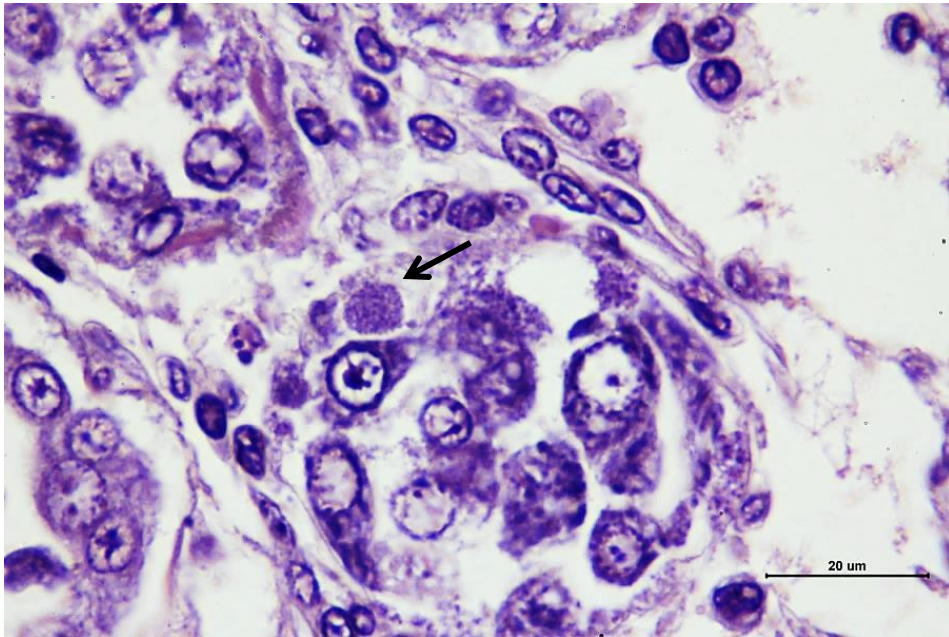
ภาพที่ 16 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* (ลูกศรชี้) แทรกอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 2 ที่กำลังขยาย 400 เท่า



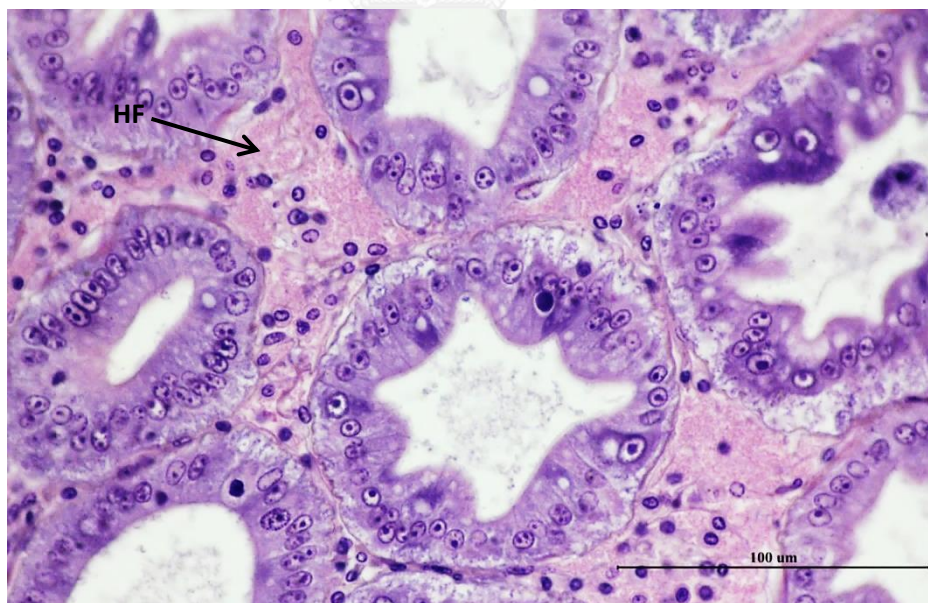
ภาพที่ 17 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* (ลูกครีซี) แทรกอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 1 ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 18 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* (ลูกครีซี) แทรกอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อน, E: e-cell ที่พบภายในท่อตับและตับอ่อนของตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 1 ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 19 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 2 (ลูกศรชี้) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



ภาพที่ 20 แสดงลักษณะการตอบสนองของร่างกายกุ้งของร่างกายกุ้งเมื่อการความเสียหายที่ตับและตับอ่อน(ลูกศรชี้) HF:hemocytic infiltration เม็ดเลือดแทรกตัวมากขึ้นภายในช่องว่างระหว่างท่อตับและตับอ่อนของตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 ที่กำลังขยาย 400 เท่า

4.4.2 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในสัตว์น้ำขนาดใหญ่

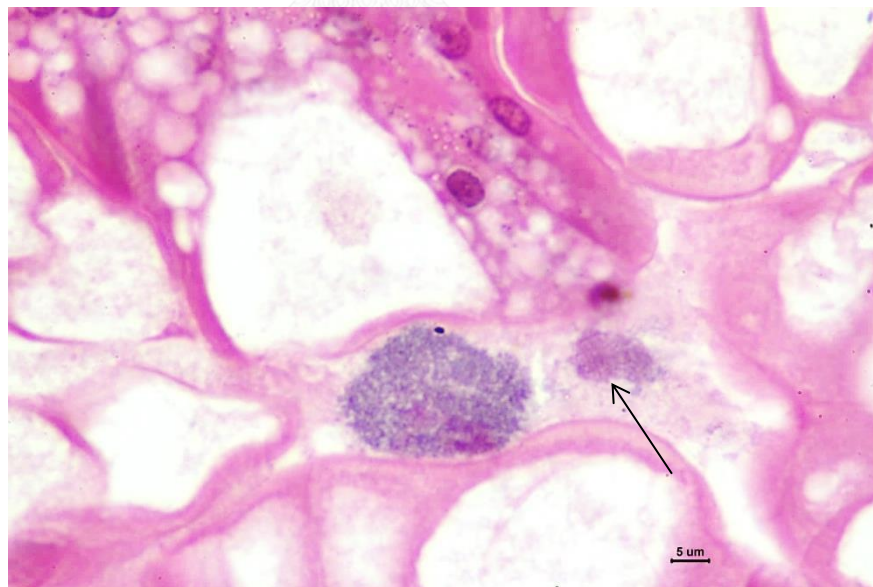
เมื่อทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสี hematoxylin-eosin ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ พบลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* แทรกตัวอยู่ที่ช่องว่างของท่อตับและตับอ่อน โดยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของที่พบจากการศึกษาในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของปูแป้น พบเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนมีช่องว่างของเม็ดไขมัน (fat vacuole) แทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อนปูแป้น ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของปูแป้น สามารถพบนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ (HN:host nuclei) ไม่พบการลอกหลุดของผนังเซลล์ท่อตับและตับอ่อน ซึ่งในตัวอย่างเดียวกันที่ ตรวจพบเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยวิธีพีซีอาร์ พบลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ภายในช่องว่างของท่อตับและตับ โดยไม่พบลักษณะปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกายต่อเชื้อเหมือนกับที่พบในตัวอย่างกุ้ง โฮสต์เซลล์ยังคงรูปและสามารถพบได้ในตับและตับอ่อนได้ (ภาพที่ 21-22)พบลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ภายในท่อตับและตับอ่อนของปูแป้นที่พบในฟาร์มกุ้งจังหวัดจันทบุรี 1 ซึ่งให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธีพีอาร์ (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 21 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างปูแป้นที่ตรวจพบเชื้อ *E.hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติ พบการสะสมของเม็ดไขมัน FV:fat vacuole (ลูกศรชี้) แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อนที่กำลังขยาย 400 เท่า



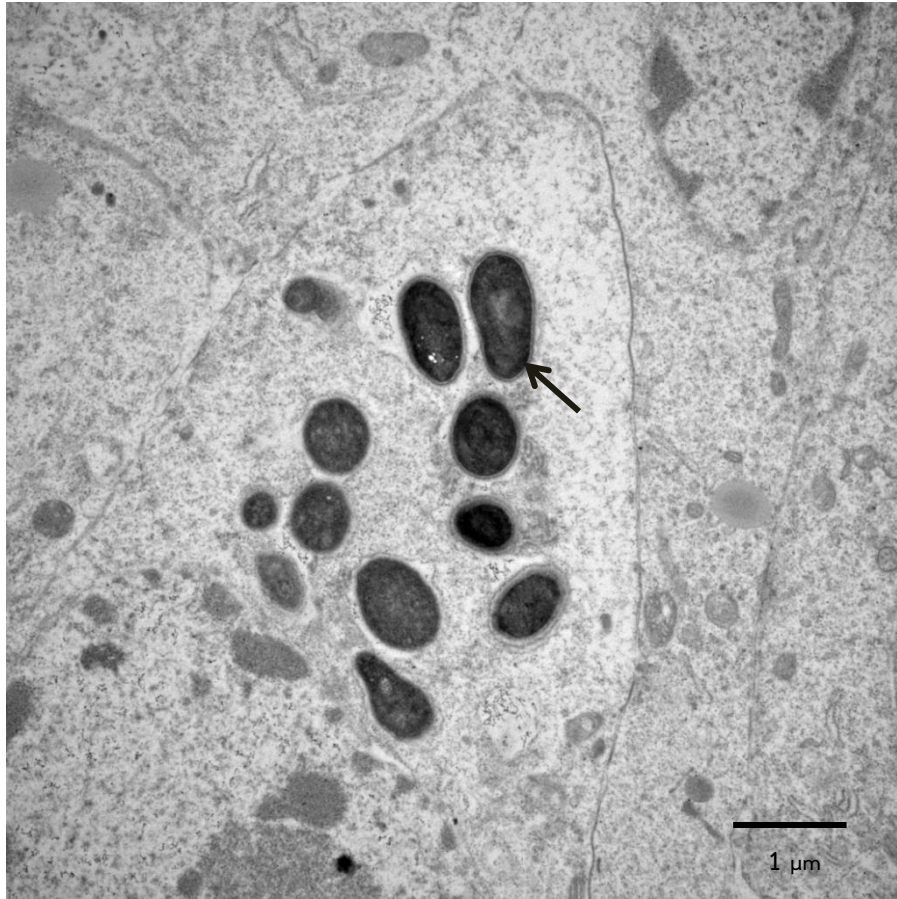
ภาพที่ 22 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนในตัวอย่างปูแป้นที่ตรวจพบเชื้อ *E.hepatopenaei* โครงสร้างของตับและตับอ่อนมีลักษณะปกติพบนิวเคลียสของโฮสต์ที่เชื่อมุ่บ่ต่อตับและตับอ่อน(ลูกศรชี้)
HN:Host nuclei ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า



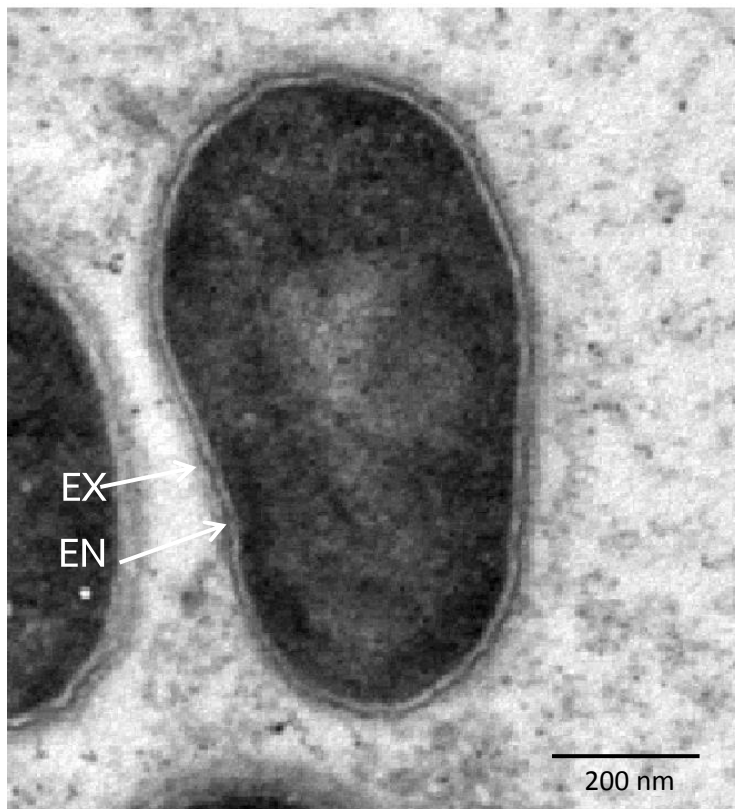
ภาพที่ 23 แสดงลักษณะโครงสร้างคล้ายกลุ่มสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* ภายในต่อตับและตับอ่อนของปูแป้นที่พบในฟาร์มกุ้งจังหวัดจันทบุรี 1 ที่ (ลูกศรชี้), ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

4.5 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope: TEM) ในกึ่งขบวนการไม

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านกับตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตรวจพบเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาภูมิต้านทานแบบอิมมูโนโกลบูลิน (immunogold) พบเชื้อไมโครสปอริเดียที่ตับและตับอ่อน แสดงระยะต่างๆของสปอร์ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของกึ่ง จะพบส่วนที่เป็นสปอร์ที่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (electron dense membrane) กลุ่มสปอร์จะแทรกตัวอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์โฮสต์ สปอร์จะมีรูปร่างเป็นทรงไข่ (oval shape) มีขนาดความยาวของสปอร์ประมาณ 1 ไมโครเมตรและส่วนของผนังสปอร์จะแบ่งเป็นสองชั้น คือ ส่วนนอก (exo spore) ที่จะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ และส่วนใน (endo spore) ที่จะโปร่งลำแสงอิเล็กตรอน ภายในสปอร์จะพบส่วนประกอบต่างๆของสปอร์ที่ใช้ในการเคลื่อนตัวของสปอร์ออกไปสู่โฮสต์อื่นๆ (extrusion apparatus) ได้แก่ anchoring disk เกลียวของ polar filament 5-6 ขด นิวเคลียส 1 อัน polar filament จะพันเป็นเกลียวล้อมรอบออร์แกนเนลล์ของสปอร์ (ภาพที่ 24-25) และอาจพบเกลียวของ polar filament ที่ถูกตัดขวางได้ 5 - 6 เกลียว ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้เอกลักษณ์ของไมโครสปอริเดีย ลักษณะของสปอร์ที่โตเต็มที่ (mature spore) ในระยะนี้สามารถพบออร์แกนเนลล์ภายใน พบ นิวเคลียสเดี่ยว (monokaryotic) การหนาตัวขึ้นของ Anchoring disk เกิดขึ้นได้เมื่อสปอร์พัฒนา โครงสร้างและเปลี่ยนเป็นระยะที่โตเต็มที่ ซึ่งในตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์น้ำขนาดใหญ่ยังไม่สามารถตรวจพบเชื้อไมโครสปอริเดียได้



ภาพที่ 24 เซลล์ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งที่พบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ลูกศรชี้) ระยะ early plasmodium ของสปอร์ที่ภายในยังไม่สามารถมองเห็นออร์แกเนลล์ของสปอร์ได้อย่างชัดเจน อยู่ในช่วงการพัฒนาให้เกิดโครงสร้างภายในสปอร์แทรกตัวอยู่ในไซโทพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ตามแถบมาตราส่วน 1 ไมโครเมตร



ภาพที่ 25 ภาพตัดขวางของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งที่พบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน สปอร์ระยะ early plasmodium สามารถเห็นขอบเขตของผนังสปอร์ 2 ชั้น (double layer nuclear membrane) ซึ่งแยกตัวออกจากกันอย่างชัดเจน แบ่งออกเป็นผนังชั้นนอกและผนังชั้นใน EX:exospore ผนังด้านนอกของสปอร์ที่ติดต่อลำแสงอิเล็กตรอน EN:endospore ผนังภายในของสปอร์ที่โปร่งต่อลำแสงอิเล็กตรอน ภายในยังไม่สามารถมองเห็นออร์แกเนลล์ของสปอร์ได้อย่างชัดเจน อยู่ในช่วงการพัฒนาให้เกิดโครงสร้างภายในสปอร์ซึ่งจะพบสปอร์ที่ปล้ำแสงอิเล็กตรอน ตามแถบมาตราส่วน 200 นาโนเมตร

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

5.1.1 ศึกษาการติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ในกุ้งและสัตว์น้ำขนาดใหญ่

จากการทดลองพบว่ามี การติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ในกุ้งขาวแวนไมที่เลี้ยงในเขตน้ำจืด (จังหวัดฉะเชิงเทรา) และในน้ำเค็ม (จันทบุรี) ทั้งนี้จากการเฝ้าติดตามการติดเชื้อ ทำให้ทราบว่า เชื้อ *E. hepatopenaei* สามารถเพิ่มจำนวนและมีการเจริญในร่างกายของกุ้งขาวแวนไม ได้แสดงให้เห็นว่า ความเค็มของน้ำที่ต่างกันไม่มีผลต่อความสามารถในการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ในโฮสต์เดียวกัน เพราะเชื้อสามารถติดเข้าสู่ร่างกายกุ้งและเพิ่มจำนวนได้ทั้งในกุ้งขาวแวนไมที่เลี้ยงในเขตน้ำจืดและน้ำเค็ม ไมโครสปอริเดียชนิดนี้มีความสามารถในการติดเชื้อคล้ายกับไมโครสปอริเดียชนิด *Loma salmonae* ที่พบเชื้อได้ในปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*) ได้ทั้งที่เลี้ยงในน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยสปอร์ของเชื้อจะผ่านสิ่งขับถ่ายของโฮสต์และติดสู่ปลาจากการกินสิ่งขับถ่ายหรือเชื้อแทรกตัวเข้าไปยังเซลล์ซีเหงือกของปลาโดยตรง (Docker et al., 1997) จากการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในบ่อกุ้งที่เลี้ยงในน้ำจืด และน้ำเค็ม พบว่ามีชนิดของสัตว์ที่แตกต่างกันไปตามความเค็มของน้ำที่อยู่อาศัย เช่น ปูที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งน้ำจืดจะเป็น ปูนา (*Sayamia bangkokensis*) ส่วนปูที่พบในฟาร์มน้ำเค็มจะเป็นปูแสมก้ามแดง (*Episesarma mederi*) ปูแสมก้ามม่วง (*Episesarma versicolor*) และปูแป้น (*Varuna litterata*) สำหรับกุ้งชนิดอื่นนอกเหนือจากกุ้งขาวแวนไม ที่พบในฟาร์มน้ำจืด คือ กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบกุ้งชนิดอื่นในบ่อนอกเหนือจากกุ้งขาวแวนไม ในฟาร์มที่เลี้ยงด้วยน้ำเค็ม ปลาที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งน้ำจืด คือ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปลาบู่ใส (*Gobiaterus chuno*) ส่วนปลาที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งน้ำเค็ม คือ ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) และปลาดุกเตนนิน (*Blenniidae* sp.) ทั้งนี้ ปลาบู่ (*Mugilogobius platynotus*) เป็นปลาชนิดเดียวในการศึกษาที่สามารถพบได้ทั้งในฟาร์มน้ำจืดและน้ำเค็ม หอยที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งน้ำจืด คือ หอยโข่ง (*Pila ampullacea*) และหอยที่พบได้ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งน้ำเค็ม คือ หอยขี้กา (*Telescopium telescopium*) และหอยถ่าน (*Faunas ater*) จากสัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่สำรวจพบทั้งหมด อาจสรุปเป็นกลุ่มๆ ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ปลา (Ichthys) ครัสตาเซียน (crustacean) และหอย (mollusc) ซึ่งผลที่ได้จากการตรวจหาเชื้อ *E. hepatopenaei* ด้วยเทคนิคทางพีซีอาร์พบว่า สัตว์น้ำในกลุ่มครัสตาเซียน สามารถติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ได้ โดยสัตว์กลุ่มครัสตาเซียนที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเขตน้ำจืดและน้ำเค็มมีความสามารถในการติดเชื้อไมโครสปอริเดียไม่ต่างกัน กล่าวคือ ปูนา และกุ้งก้ามกราม ที่พบในน้ำจืดของฟาร์มฉะเชิงเทราฟาร์มที่ 1 และ 2 สามารถติดเชื้อไมโครสปอริเดียได้เช่นเดียวกับปูแสมก้ามแดง, ปูแสมก้ามม่วง และปูแป้น ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งน้ำเค็มในจังหวัดจันทบุรี ที่ 1 และ 2 ในขณะที่ไม่พบเชื้อในปลา และหอยทั้งในฟาร์มที่เลี้ยงด้วยน้ำจืดและน้ำเค็ม โดยมีรายงานการตรวจพบ การติดเชื้อไมโครสปอริเดียในกลุ่มครัสตาเซียน เช่นการติดเชื้อไม

โครสปอริเดียชนิด *Thelohania contejeani* ติดเชื้อในกล้ามเนื้อของกุ้ง cray fish (*Austropotamobius pallipes*) ซึ่งสัตว์ในกลุ่มครัสเตาเซียหลายชนิดเป็นสัตว์ที่มีความสามารถในการติดเชื้อโครสปอริเดีย (Stentiford et al., 2013) จากการตรวจหาเชื้อ *E. hepatopenaei* ในปลาทั้งในฟาร์มน้ำจืดแลฟาร์มน้ำเค็ม ไม่พบเชื้อโครสปอริเดียชนิดนี้ แต่มีรายงานการศึกษาถึงความสามารถในการติดเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไปสู่กุ้งในบ่อได้ในโครสปอริเดียชนิดอื่น เช่น โครสปอริเดียชนิด *T. penaei* ซึ่งเป็นโครสปอริเดียที่ทำให้เกิดโรคงุ้งหลังขาว (cotton shrimp) โดยพบว่าโรคนี้อาจติดต่อกันผ่านการกินสปอร์เข้าไปในร่างกายของกุ้ง จากการที่กุ้งกินกุ้งที่มีเชื้อนี้เข้าไปในร่างกาย และยังไม่มีรายงานการติดเชื้อนี้ในสัตว์ชนิดอื่นที่อาจนำโรคนี้นี้เข้าสู่ฟาร์มกุ้งได้ การติดเชื้อในสัตว์อื่นที่อยู่ในฟาร์มกุ้งในจังหวัดสงขลาจากบ่อกุ้งที่ติดเชื้อ *T. penaei* ทำการศึกษาตั้งแต่เดือนมิถุนายนจนถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2537 จากการสังเกตอาการของกุ้งที่มีลักษณะกล้ามเนื้อขาว ขุ่นกลางหลัง และทำการตรวจยืนยันวิธีการของโรคพบว่าเกิดจากเชื้อ *T. penaei* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ และทำการเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่พบในบ่อกุ้งที่มีการติดเชื้อ จากตัวอย่างสัตว์ 22 ชนิดพบว่า มี 2 ชนิดที่ให้ผลบวกกับเชื้อ *T. penaei* คือ ปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) และ ปลาตะกรับ (*Scatophagus argus*) ที่อาจถ่ายทอดเชื้อโครสปอริเดียชนิด *T. penaei* สู่กุ้งได้ (Pasharawipas et al., 1994) เช่นเดียวกับ สิ่งขับถ่ายจากปลา Spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*) ที่กินกุ้งที่ติดเชื้อโครสปอริเดียเข้าไปแล้วนำมาให้กุ้งที่ไม่มีเชื้อกิน พบว่ากุ้งสามารถติดเชื้อโครสปอริเดียได้ (Iversen and Kelly, 1976) ที่นำสิ่งขับถ่ายของปลาทะเลขาว (*Lates calcarifer*) ที่กินกุ้งที่มีเชื้อ *T. penaei* แล้วนำสิ่งขับถ่ายนั้น ไปให้กุ้งที่ไม่มีเชื้อกินพบว่า กุ้งสามารถติดเชื้อ โครสปอริเดียได้เช่นเดียวกัน (สาริต, 2553) การติดเชื้อโครสปอริเดียในสัตว์มีรายงานการพบเชื้อในสัตว์กลุ่มครัสเตาเซียได้จำนวนมากโดยเชื้อจะติดเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ผ่านทางกรกิน (Overstreet, 1973) เชื้อโครสปอริเดียที่เข้าสู่ร่างกายผ่านระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ โครสปอริเดียในกลุ่ม *Enterocytozoon* ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถก่อโรคได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก เช่น *E. bienersi* (Reetz et al., 2002) และในสัตว์น้ำที่มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา ได้แก่ *E. salmonis* ซึ่งสามารถก่อให้เกิดโรคในปลาแซลมอน (*O. tshawytscha*) ได้ (Barlough et al., 1995) นอกจากนี้ในสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลังพบรายงานการติดเชื้อได้เช่นกันโดยในหอยzebra mussel (*Dreissena polymorpha*) สามารถพบเชื้อ *E. bienersi* ได้ (Graczyk et al., 2004) หรือ *E. hepatopenaei* ที่ติดในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไม (Tourtip et al., 2009) *Enterospira canceri* ในปู (*Cancer pagurus*) ได้ ซึ่งเชื้อชนิดนี้จะพบการแบ่งตัวภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนของปู edible crab ต่างจากโครสปอริเดียชนิด *E. bienersi* และ *E. hepatopenaei* จะเห็นได้ว่า เชื้อในกลุ่มโครสปอริเดียสามารถพบได้ในสัตว์หลายชนิด ทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง โดยโครสปอริเดียแต่ละชนิดจะมีชีววิทยาที่ไม่เหมือนกัน ตามชนิดของโฮสต์ ตำแหน่งอวัยวะที่เชื้อเข้าไปอาศัยอยู่หรือทำลาย ลักษณะการแบ่งตัวของเชื้อ เป็นต้น อย่างไรก็ตามเชื้อโครสปอริเดียเกือบทั้งหมดจะมีสภาวะเป็นปรสิต กล่าวคือ จะแย่งพลังงานจากโฮสต์มาใช้ในการเจริญเติบโตและเมื่อภูมิคุ้มกันของโฮสต์ลดลง เชื้อโครสปอริเดียจะเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัว (Weiss, 2001)

5.1.2 การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อในฟาร์ม

จากผลการทดลองพบว่า กุ้งขาวในฟาร์มเลี้ยงที่จังหวัดฉะเชิงเทราฟาร์มที่ 1 บ่อที่ 1 พบเชื้อไมโครสปอริเดียในตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวา แต่พบเชื้อในตัวอย่างดินในวันที่เริ่มเลี้ยงกุ้ง บ่อที่ 2 และ 3 ไม่พบเชื้อในตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวา และพบเชื้อจากตัวอย่างดินในวันที่เริ่มเลี้ยงกุ้ง โดยในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงพบว่า ตรวจพบเชื้อไมโครสปอริเดียในตัวอย่างกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่และดินของทุกบ่อ ฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราฟาร์มที่ 2 พบเชื้อไมโครสปอริเดียในตัวอย่างลูกกุ้งและตัวอย่างดินทุกบ่อในวันที่เริ่มเลี้ยงกุ้ง โดยในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงตรวจพบเชื้อไมโครสปอริเดียในตัวอย่างกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ และตัวอย่างดินทุกบ่อ ในขณะที่ฟาร์มเลี้ยงที่จังหวัดจันทบุรีฟาร์มที่ 1 และฟาร์มที่ 2 ไม่พบเชื้อในตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวาและตัวอย่างดินในวันที่เริ่มเลี้ยงแต่ในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงพบเชื้อไมโครสปอริเดียในตัวอย่างกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ และดิน โดยลักษณะการตรวจพบเชื้อจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การพบเชื้อไมโครสปอริเดียในตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวาในวันที่เริ่มเลี้ยงอาจเกิดจากลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวาได้รับเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ (brood stock) ซึ่งเป็นลักษณะการถ่ายทอดเชื้อทางแนวตั้ง (vertical transmission) (Dunn et al., 2001) หรืออาจเกิดจากการที่โรงเพาะเลี้ยงลูกกุ้งในระยะโพสต์ลารวามีเชื้อไมโครสปอริเดียชนิดปนเปื้อนอยู่ ทำให้ลูกกุ้งได้รับเชื้อแล้วติดมาเป็นการติดเชื้อทางแนวนราบ (horizontal transmission) จึงตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่วันที่เริ่มเลี้ยง จากนั้นจึงมีการแบ่งตัวของเชื้อไมโครสปอริเดียในตัวกุ้งแล้วเกิดการแพร่กระจายของเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจปนออกมากับสิ่งขับถ่าย เกิดการสะสมอยู่ในตะกอนดินกันบ่อ จึงตรวจพบเจอเชื้อในดินหลังจากสิ้นสุดการเลี้ยง โดยในกรณีที่มีการจัดการหรือการพักบ่อที่ไม่ดีพอ อาจทำให้มีเชื้อค้างอยู่ในดินก่อนเริ่มทำการเลี้ยงกุ้ง ทำให้ลูกกุ้งที่ไม่มีเชื้อเกิดการติดเชื้อ และตรวจพบเชื้อในกุ้งในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง นอกจากนี้การได้รับเชื้อของสัตว์น้ำขนาดใหญ่ภายในบ่ออาจเกิดจากการได้รับเชื้อโดยตรง หรือจากการกินเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในตะกอนดินเข้าไปทำให้ตรวจพบเชื้อได้ ในกรณีที่ตรวจไม่พบเชื้อทั้งในลูกกุ้งและดินในวันเริ่มต้นการเลี้ยง แต่พบได้ทั้งในกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ และในดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง อาจเกิดได้จากการที่สัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่ติดมากับน้ำที่นำมาใช้เลี้ยงกุ้งหรือจากการที่สัตว์มีเชื้ออยู่เดิมมาจากบ่ออื่น ๆ แล้วมาปล่อยเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมภายในบ่อ เมื่อกุ้งได้รับเชื้อหรือมีการปนเปื้อนเข้าไปโดยการกิน ทำให้กุ้งเกิดการติดเชื้อ มีการเพิ่มจำนวนและการแพร่กระจายไปสู่กุ้งทั้งบ่อ รวมทั้งเกิดการสะสมในตะกอนดินได้

ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งในฟาร์มฉะเชิงเทราที่ 1 และ 2 ในวันที่เริ่มเลี้ยงน้ำจะมีสีน้ำตาลอ่อน และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงจะมีสีน้ำตาลขุ่น มีตะกอนมาก โดยฟาร์มฉะเชิงเทราที่ 2 จะมีตะกอนในน้ำมากกว่าฟาร์มฉะเชิงเทราที่ 1 และมีตะกอนมากขึ้นในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง ตัวอย่างดินในฟาร์มฉะเชิงเทรา ที่ 1 และ 2 ในวันที่เริ่มเลี้ยงกุ้งพบว่า ลักษณะดินในฟาร์มฉะเชิงเทรา ที่ 1 มีสีน้ำตาลเข้มไม่อัดแน่น แต่ดินในฟาร์มฉะเชิงเทราที่ 2 พบว่าดินในวันที่เริ่มเลี้ยงจะไม่แห้ง มีสีน้ำตาลและอุ้มน้ำ

เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงพบว่าทั้ง 2 ฟาร์ม เกิดดินเลนสีดำขึ้นที่พื้นบ่อและมีกลิ่นไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยจะมีดินเลนสีดำปริมาณมากในฟาร์มฉะเชิงเทราที่ 2 ลักษณะน้ำของฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี ที่ 1 และที่ 2 จะพบว่าน้ำใส และมีสีเขียว ในวันแรกที่เริ่มเลี้ยง โดยในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงพบว่า ลักษณะน้ำจะมีความขุ่นมากขึ้น มีสีน้ำตาลปนเขียว ซึ่งสีเขียวในน้ำที่พบตลอดการเลี้ยงกึ่งเป็นแพลงก์ตอนพืชชนิด *Chaetoceros* ที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเลี้ยงกึ่งและได้รับแสงแดด ดินในฟาร์มจันทบุรีที่ 1 และ ที่ 2 เป็นดินอัดแน่นที่พื้นบ่อ และเป็นดินลูกรังแข็งออกสีน้ำตาลตามลำดับ โดยในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงพบว่าลักษณะของดินที่พื้นบ่อยังคงอัดแน่นอยู่มีเลนสีน้ำตาลเกิดขึ้นที่กลางบ่อไม่มาก แต่ไม่พบกลิ่นไฮโดรเจนซัลไฟด์เหมือนในฟาร์มฉะเชิงเทรา การเตรียมดินพื้นบ่อ ในวันที่เริ่มเลี้ยงกึ่งให้ดี พื้นดินในบ่อแน่น จนถึงวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง จะทำให้การจับตัวของเศษอาหารหรือสิ่งขับถ่ายที่เกิดภายในบ่อกึ่งกับดินที่พื้นบ่อเกิดเป็นดินเลนได้น้อย ซึ่งหากเตรียมดินในพื้นบ่อไม่ดี พื้นบ่อไม่แน่น จะทำให้การจับตัวของเศษอาหารที่กึ่งกินเหลือหรือสิ่งขับถ่ายที่เกิดขึ้นภายในบ่อกึ่ง จะรวมตัวทับถมเป็นดินเลนหนาตัวขึ้น เกิดการหมักหมมของของเสียที่พื้นบ่อ ทำให้เกิดดินเลนเป็นสีดำและมีกลิ่นเหม็น และอาจทำให้เกิดการคั่งค้างของสปอร์ในดินที่พื้นบ่อได้นานขึ้น อันเนื่องจากการทับถมของดินเลนจากรอบการเลี้ยงกึ่งครั้งก่อนจากพื้นบ่อได้ตัวอย่างเช่นในฟาร์มฉะเชิงเทราที่ 1 และ 2 ซึ่งหากพื้นบ่อสกปรก อาจส่งผลต่อสุขภาพของกึ่งได้ (Smith et al., 2003) โดยทำให้ภูมิคุ้มกันของกึ่งลดลงและเชื้อไมโครสปอริเดียที่เป็นเชื้อฉวยโอกาสอาจเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น (Tangprasittipap et al., 2013)

5.1.3 การศึกษาเปรียบเทียบขนาดความยาวและน้ำหนักของตัวกึ่ง

การศึกษาเปรียบเทียบขนาดความยาวและน้ำหนักของตัวกึ่งที่ได้ในวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง เพื่อดูความแตกต่างของขนาดและน้ำหนักกึ่งในทุกบ่อของแต่ละฟาร์ม โดยวัดสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักและความยาวของตัวกึ่ง ฟาร์มจันทบุรีที่ 1 มีค่าน้อยที่สุด และฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีที่ 2 ฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 1 และ 2 มีค่ามากขึ้นตามลำดับ ซึ่งการศึกษาข้อมูลน้ำหนักตัวของกึ่งกุลาค่าที่เกิดภาวะโตช้า พบว่าเมื่อทำการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนโดยนำกึ่งซึ่งน้ำหนักเปรียบเทียบกัน 20 ตัวในบ่อที่มีขนาดแตกต่างกันพบว่า หากมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ กึ่งจะมีน้ำหนักตัวแตกต่างกัน (Chayaburakul et al., 2004) โดยจากผลของการเก็บตัวอย่างกึ่งในฟาร์มตัวอย่างทั้ง 4 ฟาร์มพบว่ากึ่งในฟาร์มฉะเชิงเทราบ่อที่ 2 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขนาดตัวแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ของขนาดความยาวกึ่ง พบว่า กึ่งที่มาจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี ที่ 1 มีค่าน้อยที่สุด กึ่งที่มาจากฟาร์มจันทบุรีที่ 2 จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่ 1 และ 2 มีค่ามากขึ้นตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาวของตัว

กุ้ง ตามการศึกษาเปรียบเทียบขนาดความยาวของกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงกุ้งที่ต่างกัน โดยนำกุ้งขาวแวนนาไมมาเลี้ยงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งมาแล้วโดยไม่บำบัด และน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งแล้วมาบำบัดด้วยแบคทีเรียที่สามารถลดค่าของเสียในน้ำ ได้แก่ แอมโมเนีย (ammonia) และไนโตรท์ (nitrite) พบว่าในบ่อน้ำที่ผ่านการบำบัดมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาวกุ้ง น้อยกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งจะมีขนาดความยาวไม่แตกต่างกัน แต่ในบ่อที่เลี้ยงด้วยน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งแล้วนำกลับมาใช้ใหม่ โดยไม่ผ่านการบำบัด พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของขนาดความยาวกุ้งมากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ กุ้งมีขนาดตัวแตกต่างกัน (Leungprasert and Chanakul, 2010) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากุ้งในฟาร์มฉะเชิงเทรา ที่ 2 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของความยาวตัวกุ้งมากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งจะมีขนาดตัวแตกต่างกัน ทั้งนี้การติดเชื้อไมโครสปอริเดียอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้กุ้งบางตัวโตช้า เนื่องจากเชื้อจะอาศัยและเจริญเติบโตภายในไซโตพลาสซึมของโฮสต์ โดยไม่มีไมโทคอนเดรีย ภายใน จึงต้องอาศัยแหล่งพลังงาน ATP จากเซลล์ของกุ้ง ในการเจริญเติบโตและแบ่งตัว (Stentiford et al., 2013) เซลล์เยื่อบุท่อตับและตับอ่อนของกุ้งมีหน้าที่ในการผลิตแอนติบอดี B-cell จะพบมากที่สุด โดยสรุปคือ ตับ และตับอ่อน ทำหน้าที่ผลิต และ หลั่งแอนติบอดีโดย F-cell ทำหน้าที่ย่อย และ ดูดซึมโดย B-cell สะสมอาหารในรูปแบบไขมันใน R-cell (Lehnert and Johnson, 2002) ซึ่งในกุ้งที่พบการติดเชื้อไมโครสปอริเดียจะพบว่ามีเม็ดไขมันและ B-cell น้อย เป็นสาเหตุให้กระบวนการการย่อยอาหาร การสร้างพลังงาน ลดลงส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง จากการศึกษาในตัวอย่างกุ้งที่มีการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* จะพบว่ามีปริมาณเม็ดเลือด (hemocyte) น้อยกว่าในกุ้งที่ไม่มีการติดเชื้อ และกุ้งที่มีเชื้อมีลักษณะแคระแกร็นและโตช้า (จิรศักดิ์, 2555) เชื้อ *E. hepatopenaei* ทำให้กุ้งขาดแหล่งพลังงานและไขมันนำไปให้กุ้งไม่โต ในฟาร์มตัวอย่างทั้ง 4 ฟาร์ม ฟาร์มในจังหวัดจันทบุรีฟาร์มที่ 1 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักและขนาดความยาวของตัวกุ้งต่ำ พบกุ้งมีขนาดตัวไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับ กุ้งในฟาร์มฉะเชิงเทราที่ 2 ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของน้ำหนักและขนาดความยาวของตัวกุ้งสูง และพบกุ้งมีขนาดตัวแตกต่างกันอย่างชัดเจน

5.1.4 การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

การศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาด้วยการย้อมสี hematoxylin – eosin พบสปอร์ของเชื้อไมโครสปอริเดียภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ให้ผลบวกจากการทำพีซีอาร์ โดยในตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 1 และ จันทบุรีที่ 2 พบเชื้อไมโครสปอริเดียร่วมกับมีการเสื่อมของเซลล์เยื่อบุท่อตับและตับอ่อน (degenerate hepatopancreatic epithelial cell) โดยมีการลอกหลุดของผนังของเยื่อบุท่อตับและตับอ่อน แสดงให้เห็นถึงการถูกทำลายของเนื้อเยื่อจากการตอบสนองของร่างกายกุ้งต่อการติดเชื้ออย่างรุนแรง (Flegel, 2012) นอกจากนี้ยังพบการแทรกตัวของเม็ดเลือด (hemocyte infiltration) ภายในช่องว่างระหว่างท่อตับและตับอ่อนในตัวอย่างกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการตอบสนองของเนื้อเยื่อและบ่งบอกถึงภาวะการอักเสบ (Costa et al., 2009) ในขณะที่ตัวอย่างกุ้งจากจังหวัดจันทบุรีฟาร์มที่ 1 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ จากการตอบสนองของเชื้ออย่างชัดเจน พบเพียงสปอร์ของเชื้อไมโคร

รสปอริเดียในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อนของกิ้งเพียงบางเซลล์เท่านั้น แสดงให้เห็นว่า กิ่งจากฟาร์มนี้อาจมีการติดเชื้อในระดับต่ำ เนื่องจากยังพบเซลล์ชนิด R (reserve) cell, B (blister) cell และ E (embryonic) cell ที่ไม่ได้ลอกหลุดหรือถูกทำลายเหมือนกับฟาร์มอื่น (Tangprasittipap et al., 2013) โดยลักษณะของสปอร์ที่พบจากงานวิจัยนี้ มีการแทรกตัวอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อน ติดสีน้ำเงิน (basophilic) คล้ายกับการพบเชื้อไมโครสปอริเดียในกิ้งกุลาดำโดยการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี hematoxylin - eosin ที่พบเชื้อแทรกตัวอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อน โดยเกิดเป็นช่องว่าง (vacuole) เกิดขึ้นก่อนที่จะเริ่มพัฒนาโครงสร้างภายในสปอร์ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อน จนมีการพัฒนาเป็นสปอร์ที่โตเต็มที่ (mature spore) พร้อมจะติดไปยังเซลล์อื่นต่อไป โดยสปอร์ที่พบมีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร แทรกตัวอยู่รอบผนังท่อตับและตับอ่อน สปอร์จะมีลักษณะคล้ายกับ B-cell ของเซลล์ตับและตับอ่อนของกิ้ง ทำให้บางครั้งทำการแยกความแตกต่างของสปอร์ออกจากเซลล์ของตับและตับอ่อนได้ยาก โดยสามารถใช้วิธีตรวจด้วยสารเรืองแสง (*in situ* hybridization) ซึ่งจะทำให้เกิดการเรืองแสงของสปอร์ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจะสามารถแยกได้ว่าเชื้อไมโครสปอริเดียจะแทรกตัวอยู่ภายในเซลล์ตับและตับอ่อนเท่านั้น โดยไม่พบเชื้อแทรกตัวไปยังเซลล์ที่ผลิตเอนไซม์รอบ ๆ เยื่อผนังท่อตับและตับอ่อน (e cell) แต่บางระยะของสปอร์ที่กำลังมีการพัฒนาจะพบเป็นก้อนอินคลูชัน (inclusion) แทรกอยู่ในเซลล์เยื่อหุ้มรอบ ๆ ท่อตับและตับอ่อน กิ่งที่มีการติดเชื้อรุนแรงจะพบเชื้อแทรกตัวอยู่ได้ทั้งภายในท่อตับและตับอ่อนทั้งส่วนต้น (proximal) และส่วนกลาง (medial) และพบเชื้อไมโครสปอริเดียในระยะต่าง ๆ ได้ในเซลล์ที่อยู่บริเวณใกล้เคียงกัน (Tangprasittipap et al., 2013)

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อสัตว์น้ำขนาดใหญ่ เช่น ปูแป้น ที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดีย พบสปอร์อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อตับและตับอ่อน โดยไม่พบลักษณะการตอบสนองของร่างกายมากเท่ากับในกิ้ง แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อไมโครสปอริเดียที่พบอาจมีในระดับต่ำ หรือ สัตว์น้ำขนาดใหญ่เหล่านี้อาจเป็นสัตว์พาหะ (vector) หรือสัตว์กักเก็บโรค (reservoir host) ของเชื้อ ทำให้พบการยอมรับของเนื้อเยื่อต่อเชื้อไมโครสปอริเดีย โดยสัตว์ไม่แสดงอาการป่วยหรือความผิดปกติใดๆ แต่อาจเป็นแหล่งที่มีการแพร่ของเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมแล้วทำให้เกิดการติดเชื้อสู่กิ้งได้ โดยการคงอยู่ของเชื้อไมโครสปอริเดียในร่างกายช่วงระยะเวลาหนึ่งของสัตว์ จะเรียกว่าเป็นสัตว์พาหะนำโรค (mechanical vector) โดยขณะที่เชื้ออยู่ในร่างกายสัตว์จะมีกลไกทำให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ โดยไม่ถูกทำลายจากระบบการป้องกันตนเองของร่างกายสัตว์ เช่นเดียวกันเมื่อเชื้ออยู่ในสิ่งแวดล้อม ก็จำเป็นต้องมีกลไกในการป้องกันตนเองจากอันตรายในสิ่งแวดล้อม เช่น สร้างสปอร์ให้มีความสามารถทนต่อการถูกทำลายนั่นเอง (Didier et al., 2000)

5.1.5 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

สำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน มีการศึกษาเชื้อไมโครสปอริเดียครั้งแรกโดย (Weiser, 1959) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างภายในของสปอร์ โดยส่วนบนของสปอร์มีส่วน Extrusion apparatus ที่สปอร์จะใช้แทรกตัวเข้าสู่โฮสต์เซลล์ได้ ตำแหน่งนี้เรียกได้หลายชื่อ เช่น special organelle, dense lines หรือ polar plast มีหน้าที่สำคัญคือ การถ่ายทอดสปอโรพลาสซึม (sporoplasm) ของสปอร์ที่โตเต็มที่ (mature spore) แล้วไปแทรกยังเซลล์โฮสต์ใกล้เคียง โดยอาศัยการยึดของ polar filament จากส่วนบนของสปอร์ และแรงดันจากส่วนท้ายของสปอร์ที่เกิดเป็นช่องว่าง (posterior vacuole) เกิดแรงดันทำให้ท่อ polar filament ที่ขดเป็นเกลียวถูกดันออก และปล่อย สปอโรพลาสซึม (sporoplasm) เข้าสู่เซลล์โฮสต์ข้างเคียง เป็นการเพิ่มจำนวนของสปอร์ต่อไป สำหรับโครงสร้างภายในสปอร์ (Takvorian et al., 2006) ได้ทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างของสปอร์ไว้ดังนี้ สปอร์จะมีชั้นผนังของสปอร์ 2 ชั้น (double membrane layer) ผนังของสปอร์ภายนอกจะหนาเรียกว่า เอกโซสปอร์ (exospore) ชั้นถัดมาเป็นผนังส่วนใน เรียกว่า เอนโดสปอร์ (endospore) จะบางกว่า ส่วน extrusion apparatus ประกอบไปด้วย anchoring disk, polar filament, lamellar polar plast และ tubular polar plast ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของไมโครสปอริเดียจากการดูส่วนของ extrusion apparatus โดยนับจำนวนรอบขดของ polar filament ที่พันรอบสปอร์ได้ ด้านล่างของสปอร์จะพบช่องว่างภายในสปอร์เรียกว่า posterior vacuole มีลักษณะเป็นผนังขรุขระ (membrane bound vesicle) หรือเรียกว่า membrane whirl หรือ glomerular-like ได้ ภายในสปอร์มีไซโทพลาสซึมมีไรโบโซมที่ติดแน่นอยู่กับเกลียวของ polar tube นิวเคลียสภายในสปอร์อาจพบนิวเคลียสเดี่ยวหรือ 2 นิวเคลียส (diplokaryon) ซึ่งไมโครสปอริเดียแต่ละชนิดจะมีจำนวนต่างกัน เช่น สปอร์ของเชื้อ *Thelohania giardi* นิวเคลียสจะแบ่งจากเซลล์เดี่ยวไปเป็น 2 เซลล์ และจะแบ่งตัวจนเกิดสปอร์ในระยะโตเต็มที่ จำนวน 8 สปอร์ใน ถุงสปอร์เดียวกัน ขนาดของสปอร์จะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไมโครสปอริเดีย ซึ่งพบว่ามีขนาดที่หลากหลายตั้งแต่เล็กกว่า 1 ไมโครเมตร จนถึงใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร จำนวนของ polar filament มีจำนวนรอบที่ต่างกันตั้งแต่จำนวนน้อยจนถึง 30 ขด *Thelohania penaei* ที่จะพบลักษณะนิวเคลียสมี 2 นิวเคลียส (diplokaryote) และนิวเคลียสจะลดลงเหลือเพียงนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryote) เมื่อเข้าสู่ระยะ sporogony (Flegel and Pasharawipas, 1995) ไมโครสปอริเดียหลายชนิดแบ่งตัวภายในไซโทพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ได้เช่นกัน เช่นชนิด *Encephalitozoon* และชนิด *Glugoides intestinalis* มี parasitophorous vacuole ในระยะแรกของการแบ่งตัว ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ถูกไซโทพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ทำลาย (Cali et al., 1993) ในไมโครสปอริเดียชนิด *Vavraia mediterranea* จะพบลักษณะเนื้อเยื่อหนา 2 ชั้น (double-layered membrane) แบบเดียวกับเชื้อ *E. hepatopenaei* แต่ผนังจะบางกว่า ซึ่งสามารถติดเชื้อภายในกล้ามเนื้อของกุ้ง

Crangon crangon แต่ยังไม่มีความรู้เกี่ยวกับสายนิวคลีโอไทด์ (Azevedo, 2001) บริเวณไซโทพลาสซึมที่พบเชื้อ *E. hepatopenaei* สามารถพบร่างแหเอ็นโดพลาสซึมแบบหยาบ (rough endoplasmic reticulum : RER) และไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากของเซลล์โฮสต์ล้อมรอบเชื้อ *E. hepatopenaei* (Lee et al., 2008) ไมโครสปอริเดียชนิด *Enterospora canceri* ที่พบในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของปู ซึ่งเป็นไมโครสปอริเดียในกลุ่ม *enterocytozoon* เช่นเดียวกับ ไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ที่พบในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแวนนาไม แต่ยังไม่พบเชื้อข้ามชนิดของโฮสต์ในไมโครสปอริเดีย 2 ชนิดนี้ การติดเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. canceri* ในปู edible crab (*Cancer pagurus*) พบลักษณะการแบ่งตัวของเชื้อภายในนิวเคลียสของเซลล์ แตกต่างกับ *E. hepatopenaei* ที่จะมีการแบ่งตัวเฉพาะภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์เท่านั้น (Stentiford et al., 2007) ในขณะที่ไมโครสปอริเดีย กลุ่ม *Enterocytozoon* เช่น *E. bienesi* จะเข้าไปยังไซโทพลาสซึมของโฮสต์เซลล์เท่านั้น เชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* มีคุณสมบัติหลายประการที่คล้ายกับ *E. bienesi* ที่เป็นเชื้อไมโครสปอริเดีย ในกลุ่มเดียวกัน ที่ทั้งสองชนิดมีระยะ sporogonial plasmodium ในไซโทพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ และมีการพัฒนาตัวเข้าสู่ระยะ sporoblast ซึ่งจะพัฒนาต่อไปจนเป็นสปอร์รูปทรงรี (oval shape) และมี posterior vacuole และขดของ polar filament ประมาณ 5-7 ขด ขนาดสปอร์ของเชื้อ *E. hepatopenaei* มีขนาด 1.1×0.7 ไมโครเมตร เล็กกว่า *E. bienesi* ซึ่งมีขนาดสปอร์ 1.5×1.0 ไมโครเมตร (Didier et al., 2000) จากการศึกษา ลักษณะโครงสร้างที่ผ่านมา พบว่ายังไม่มีความรู้เฉพาะที่สามารถใช้แยก ไมโครสปอริเดีย 2 ชนิดนี้ได้ชัดเจน โดยลักษณะของไมโครสปอริเดียชนิด *E. bienesi* ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังจะมีนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryotic nuclei) เช่นเดียวกับ *E. hepatopenaei* ที่พบในกุ้งกุลาดำ (Flegel and Pasharawipas, 1995) จากข้อมูลที่กำลังมาข้างหน้า จึงอาจกล่าวได้ว่า *E. hepatopenaei* และ *E. bienesi* มีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกัน มีตำแหน่งในการติดเข้าสู่โฮสต์และการแบ่งตัวคล้ายกัน แต่จัดเป็นคนละชนิดกันเมื่อเทียบตามลำดับนิวคลีโอไทด์ ความแตกต่างระหว่างเชื้อไมโครสปอริเดีย 2 ชนิดนี้ เมื่อเทียบลำดับสายนิวคลีโอไทด์แล้ว แต่เดิมพบว่าเชื้อไมโครสปอริเดีย *Nucleospora salmonis* และ *E. bienesi* มีความใกล้เคียงกันแต่เมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* มีลำดับสายนิวคลีโอไทด์คล้ายกับมากกว่า *E. bienesi* 84 เปอร์เซ็นต์ จึงให้เป็นไมโครสปอริเดียชนิดใหม่ ที่ใกล้เคียงกับ *E. bienesi* จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เนื้อเยื่อปูแป้น ที่แสดงผลบวกในการทำพีซีอาร์ ยังตรวจไม่พบเชื้ออาจเป็นเพราะมีปริมาณเชื้อน้อย และเทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อน้อยได้จึงทำให้ตรวจไม่พบ

5.1.6 การศึกษาด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในกึ่งและสัตว์น้ำขนาดใหญ่

ทำการศึกษาดูด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ ยืนยันการพบเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ได้เมื่อมีการวางตัวในลำดับที่ใกล้เคียงกับ ขนาดของตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอต้นแบบ ที่ถูกต้อง (positive control) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการศึกษาดูด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ใน ตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่ จะส่งไปหาลำดับสายนิวคลีโอไทด์เพื่อแสดงลำดับการเรียงตัวและ เมื่อทำ การยืนยันโดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปถอดลำดับสายนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับสายนิวคลี โอไทด์มีความคล้ายกับเชื้อไมโครสปอริเดีย ชนิด *E. hepatopenaei* ตรงกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ ใน Gene Bank เพื่อยืนยันการพบเชื้อในตัวอย่าง กุ้งก้ามกราม , ปูนา, ปูแสมก้ามแดง,ปูแสมก้ามม่วง และปูแป้น และค้นพบว่าจากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่และตัวอย่างดินในฟาร์มกุ้ง ที่ได้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ได้ส่งตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen, Inc (Korea) และทำ การตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas LITE และนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTn แสดงให้เห็น ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยู นิตรโบโซมอลอาร์เอ็นเอของ *E. hepatopenaei* ลำดับสายนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ และ ดิน พบว่าผลการตรวจมีความคล้ายกับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซับยูนิตรโบโซมอล อาร์เอ็นเอของ *E. hepatopenaei* ประมาณ 98-99 เปอร์เซ็นต์ การตรวจด้วยวิธีนี้ ใช้ระยะเวลาไม่ นาน เมื่อเทียบกับวิธีการตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดียด้วยวิธีอื่น ที่ต้องอาศัยประสบการณ์ในการแยก เชื้อออกจากเนื้อเยื่อของเซลล์ เช่น การตรวจเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา โดยการกดทับและป้ายลงบน กระดาษสไลด์ (impression smear) หรือวิธีในการตรวจด้วยสารเรืองแสง (fluorescent in situ hybridization :FISH) ซึ่งต้องใช้เครื่องมือในการตรวจมากและใช้เวลานาน หรือการตรวจด้วยกล้อง จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) ซึ่งต้องใช้เครื่องมือใน การตรวจและเตรียมตัวอย่างที่มีราคาสูงและไม่เหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างเพื่อคัดกรอง โรค ซึ่งวิธีเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นการตรวจด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อเป็นวิธี ที่รวดเร็วและเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองโรค (Ghosh and Weiss, 2009)

5.1.7 ศึกษาทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction :PCR) ในตัวอย่างดินและน้ำ

ตัวอย่างดินสามารถตรวจพบเชื้อไมโครสปอริเดียได้ เพราะในตัวอย่างดินจะมีอนุภาคที่ สามารถดูดจับเชื้อโรคได้เกิดเป็นรวมตัวกันของอนุภาค (flocculation) ที่เกิดจากการรวมตัวกันของ

อนุภาคดินที่มีขนาดเล็กและมีประจุลบสามารถจับกับเชื้อไมโครสปอริเดียจนเกิดเป็นอนุภาคขนาดใหญ่จนสามารถตกตะกอนได้ง่าย (Vesey et al., 1993) ซึ่งพบว่าชนิดของเนื้อดินมีผลต่อการกระจายตัวของเชื้อโรค เช่นการแพร่กระจายของซิสต์ของเชื้อโปรโตซัวหรือเชื้อไวรัส (Burge and Enkiri, 1978) ถึงแม้ซิสต์ของโปรโตซัวจะมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย แต่ด้วยความสามารถในการดูดจับเชื้อโรคของเนื้อดิน สามารถถึงอนุภาคของเชื้อโรคที่มีขนาดแตกต่างกันรวมอยู่กับอนุภาคดินได้ ความสามารถในการดูดจับเชื้อโรคของอนุภาคดินแตกต่างกันตามลักษณะของดิน ซึ่งความแตกต่างของพื้นผิวเม็ดดินทำให้ดินมีลักษณะของเนื้อดินต่างกัน ส่งผลต่อความสามารถในการดูดจับเชื้อโรคด้วย เช่นดินทรายจะดูดจับเชื้อโรคได้น้อยกว่าดินเหนียวหรือดินเลน ซึ่งสามารถดูดจับเชื้อโรคได้ดีกว่า (Marshall et al., 1971) อนุภาคของดินเลนจะสามารถยึดเกาะซิสต์ของ *Cryptosporidium parvum* ได้ดีกว่าดินทราย เพราะดินเลนนั้นมีพื้นผิวและประจุลบมากกว่าดินทรายจึงทำให้สามารถดูดจับเชื้อโรคได้ดีกว่า สอดคล้องกับผลการวิจัยที่พบว่า ตัวอย่างดินสามารถตรวจพบเชื้อได้ อาจเป็นผลมาจากที่ดินเลนในบ่อกึ่งที่มีคุณสมบัติในการดูดจับเชื้อไมโครสปอริเดียได้ดีกว่าในน้ำ และอาจเกิดการรวมตัวกันของอนุภาค ที่จับเชื้อที่ลอยอยู่กลางน้ำจับตกตะกอนลงสู่ดินเลนที่พื้นบ่อได้ ของเสียที่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อในดินจากฟาร์มถือเป็นมลพิษที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม การปล่อยของเสียจากฟาร์มที่ทำการเลี้ยงสัตว์จะเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ได้ ซึ่งเชื้อโรคที่ปนเปื้อนในดินอาจทำให้เกิดโรคติดต่อสู่คนได้จากดินที่ปนเปื้อนเชื้อโรคที่มาจากสิ่งขับถ่ายภายในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เช่น เชื้อ *C. parvum* (Sterling, 1990) หรือเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *Encephalitozoon* sp. ที่ทำให้กระจกตาอักเสบ (keratoconjunctivitis) ในมนุษย์ได้ การตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดียในดิน สามารถแสดงถึงสุขอนามัยในพื้นที่บริเวณนั้น อย่างไรก็ตามการทำพีซีอาร์ในตัวอย่างดินและน้ำอาจจะยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากในตัวอย่างดินและน้ำมักพบสารที่ยับยั้งการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Inhibitor) เช่นกรด humic acid จุลชีพ (microorganism) หรืออนุภาคแขวนลอยต่าง ๆ ที่ขัดขวางประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ของเชื้อได้ (Smith, 1998) ตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการตรวจผ่านแผ่นกระดาษกรอง จะมีอนุภาคแขวนลอยจำนวนมาก ซึ่งอาจยับยั้งประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ของเชื้อเช่นกัน ทั้งนี้มาตรฐานของปริมาตรน้ำที่ใช้เก็บเพื่อตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดียยังไม่มีวิธีและปริมาตรน้ำที่แน่นอน (Hoffman et al., 2007) การตรวจเชื้อไมโครสปอริเดียในน้ำทำได้ยาก เนื่องจากตัวอย่างจะต้องใช้เครื่องมือช่วยในการกรองน้ำ การใช้เครื่องกรองน้ำแบบ continuous flow centrifugation ที่ใช้ตรวจหาเชื้อ *C. parvum* (Borchardt and Spencer, 2002) การติดตั้งเครื่องกรองน้ำเพื่อเก็บตัวอย่างเชื้อจากน้ำในฟาร์มกึ่งทำได้ยาก เนื่องจากต้องเปลี่ยนไส้กรองบ่อยเพราะอนุภาคแขวนลอยในน้ำมีปริมาณมาก อีกทั้งการเก็บตัวอย่างดินและน้ำจากในฟาร์มทั้งหมดเพื่อเป็นการคัดกรองการคงค้างของสปอร์ภายในฟาร์มกึ่ง ซึ่งมีปริมาณมากและไม่สามารถทำได้ โดยปริมาณตัวอย่างที่เก็บมานั้น เป็นปริมาณที่เป็นตัวแทนของฟาร์มที่เกษตรกรสามารถเก็บ ส่ง

มายังห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นการเลี้ยงกุ้งในบ่อดินจึงควรเฝ้าระวัง การแพร่กระจายของสปอร์ของเชื้อจากในน้ำหรือดิน ที่เกิดจากการเตรียมบ่อไม่ตีเพียงพอในแต่ละรอบของการเลี้ยงกุ้ง เป็นสาเหตุให้ยังมีสปอร์คงค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นอันจะนำไปสู่ การเพิ่มจำนวนและติดสู่กุ้งในรอบการเลี้ยงครั้งใหม่ได้ต่อไปไม่สิ้นสุด

5.2 สรุปและข้อเสนอแนะ

สามารถพบเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ในกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม สัตว์น้ำขนาดใหญ่ที่พบในบ่อกุ้งสามารถพบเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ได้ทั้งในน้ำจืดและในน้ำเค็ม โดยพบเชื้อในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ปูนา (*Sayamia bangkokensis*) ปูแสมก้ามแดง (*Episesarma mederi*) ปูแสมก้ามม่วง (*Episesarma versicolor*) และปูแป้น (*Varuna litterata*) โดยสามารถพบเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ได้ตั้งแต่ลูกกุ้งระยะโพสต์ลาร์วาไปจนถึงกุ้งโตเต็มวัย ซึ่งเชื้อสามารถคงอยู่ได้ในตัวกุ้งจนถึงวันที่สิ้นสุดการเลี้ยง และยังสามารถแพร่เชื้อผ่านทางสิ่งขับถ่ายสู่สิ่งแวดล้อมภายในฟาร์ม จึงทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้ในตัวอย่างดิน และสัตว์น้ำขนาดใหญ่ภายในบ่อ ซึ่งสามารถเป็นสัตว์ที่นำเชื้อเข้าสู่บ่อและติดสู่กุ้งได้ กุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียตั้งแต่วันที่เริ่มเลี้ยงจนถึงวันที่สิ้นสุดการเลี้ยงฟาร์มฉะเชิงเทราที่ 2 มีขนาดตัวแตกต่างกันชัดเจน กุ้งที่มีการติดเชื้อไมโครสปอริเดียมาก จะพบการตอบสนองของร่างกายกุ้งมากขึ้นตามไปด้วย โดยจะพบสปอร์ของเชื้อไมโครสปอริเดียภายในร่างกายกุ้ง ถ้ามีปริมาณไม่มากจะไม่พบการตอบสนองของร่างกายกุ้งอย่างชัดเจน แต่หากพบเชื้อในร่างกายจำนวนมาก จะพบการตอบสนองของร่างกายกุ้งอย่างรุนแรง ที่เนื้อเยื่อตับและตับอ่อน จากการตรวจด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบสปอร์ของเชื้อได้ทั้งในกุ้ง โดยจะพบภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับและตับอ่อน ในสัตว์พาหะไม่พบการเสียหายของเนื้อเยื่อจากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา สัตว์น้ำขนาดใหญ่เมื่อได้รับเชื้อเข้าไปและเชื้อยังคงอยู่ในร่างกายได้แม้จะเป็นช่วงสั้นๆ ก็อาจกล่าวได้ว่าสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นสัตว์พาหะ (vector) และหากเชื้อสามารถเจริญเติบโตและอาศัยอยู่ในช่วงระยะเวลาหนึ่งของร่างกายโฮสต์เพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้สมบูรณ์พร้อมสำหรับการติดเข้าสู่โฮสต์อีกโฮสต์หนึ่งได้ สัตว์น้ำขนาดใหญ่เหล่านี้ อาจเป็นโฮสต์กักเก็บโรค (reservoir host) เพื่อติดไปยังสัตว์ชนิดอื่น ซึ่งวงจรชีวิตที่สมบูรณ์ของเชื้อไมโครสปอริเดียชนิดนี้ยังไม่ทราบข้อมูล แต่หากเชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ ถือว่าเป็นตัวกักเก็บโรคที่สามารถ แพร่เชื้อเข้าไปสู่บ่อกุ้งได้ จากการศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์และขั้นตอนวิธีการตรวจทางอนุชีววิทยาที่มีความจำเพาะ ต่อเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ยืนยันการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ทั้งในตัวอย่างจากเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้ง สัตว์น้ำขนาดใหญ่ พบว่ามีความคล้ายกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมอลซัพยูนิตรไโบโซมอลอาร์เอ็นเอของ *E. hepatopenaei* ประมาณ 98-100 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีที่รวดเร็วและเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองโรค สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจได้ การศึกษาด้วย

เทคนิคนี้ในตัวอย่างดิน สามารถตรวจพบเชื้อไมโครสปอริเดียในดินได้ แต่ในตัวอย่างน้ำอาจจะยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากยังไม่มีวิธีและปริมาตรน้ำที่ใช้เก็บเพื่อตรวจหาเชื้อไมโครสปอริเดียที่แน่นอน

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถตรวจตัวอย่างลูกกุ้งระยะโพสต์ลาร์วาซึ่งพบการติดเชื้อ *E. hepatopenaei* ที่อาจได้รับการถ่ายทอดเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์กุ้ง หรือการจัดการโรงเพาะฟักที่ไม่ได้มาตรฐาน การตรวจคัดกรองโรคเป็นประจำด้วยวิธีทางอนุชีววิทยานี้จะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อในบ่อกุ้งได้ เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในทุกๆระยะสามารถส่งตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อได้อันจะก่อให้เกิดประโยชน์ให้กับผู้เลี้ยงกุ้งทุกส่วนของการเลี้ยง หากเริ่มต้นผลิตลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อ คัดกรองพ่อแม่พันธุ์ และเริ่มต้นการเลี้ยงลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อ โดยเฝ้าระวังการปนเปื้อนเชื้อที่อาจจะมาจากภายนอกฟาร์ม และการแพร่กระจายระหว่างฟาร์ม จะเป็นการยกมาตรฐานให้กับอุตสาหกรรมกุ้งไทย ลดปัญหาการใช้ยาและสารเคมีที่อาจตกค้างในเนื้อกุ้ง และควรมีการจัดการฟาร์มที่ได้มาตรฐาน การควบคุมโรคหรือสัตว์พาหะ ก็จะสามารถทำให้รับมือกับปัญหาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยงและลดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นได้ ควรมีการพัฒนาวางระบบการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมให้ปลอดจากเชื้อไมโครสปอริเดียให้ได้อย่างสมบูรณ์ในประเทศไทย การตรวจเชื้อในตัวอย่างดินจะเป็นแนวทางในการจัดการ การเตรียมบ่อเพื่อให้ปราศจากเชื้อไมโครสปอริเดีย เมื่อพบเชื้อในดินที่จะใช้เลี้ยงกุ้งควรทำการเตรียมดินให้ดีขึ้นก่อนที่จะปล่อยกุ้ง การเตรียมบ่อที่ดี การสูบลมหรือการถ่ายน้ำออกนอกฟาร์มเป็นสิ่งที่ควรกำหนดให้เป็นมาตรฐานในการเริ่มเลี้ยงกุ้ง และการจัดการของเสียที่เกิดขึ้นระหว่างและสิ้นสุดการเลี้ยง ไม่ให้เกิดการแพร่กระจายภายในหรือสู่ภายนอกฟาร์มได้ เพราะหากยังมีสปอร์ที่คงค้างอยู่ในดินอาจทำให้เกิดการติดเชื้อแนวราบ (horizontal transmission) เข้าสู่กุ้งและอาจส่งผลกระทบต่อ การเลี้ยงกุ้งได้ นอกจากนี้ในการวางแนวทางการเลี้ยงกุ้งที่ปราศจากโรคที่เริ่มจากการคัดกรองลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อแล้ว การป้องกันไม่ให้สัตว์น้ำขนาดใหญ่เหล่านี้หลุดเข้าไปในบ่อกุ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่สามารถติดเชื้อนี้ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ เช่น กุ้งก้ามกราม , ปูนา , ปูแสมก้ามแดง, ปูแสมก้ามม่วง และปูแป้น จะช่วยลดการได้รับเชื้อและการแพร่กระจายของเชื้อสู่กุ้งได้ (vector transmission) อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นการสร้างมาตรฐานระบบความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity system) ในฟาร์มกุ้ง การเริ่มการเลี้ยงกุ้งในระบบปิด (closed system) ที่มีการวางระบบนี้ในหลายประเทศทั้งในเอเชียและยุโรป เพื่อเป็นการควบคุมและป้องกันความเสี่ยงในการแพร่กระจายเชื้อโรคเข้าสู่ฟาร์มกุ้ง และยังเป็น การสร้างมาตรฐานในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการถ่ายทอดเชื้อ (vertical transmission) เหนือสิ่งอื่นใดควรมีการศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อไมโครสปอริเดียชนิด *E. hepatopenaei* ให้สมบูรณ์เพิ่มเติมเพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์และเป็นแนวทางในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อให้มีความสมบูรณ์มากที่สุดต่อไป

รายการอ้างอิง

- จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ 2555. โรคอีเอ็มเอสในกุ้งทะเลเลี้ยงของประชาคมอาเซียน. เอกสารประกอบการสัมมนาวันที่ 15พฤศจิกายน 2555. 16 หน้า. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.
- นิมิตร มรกต และ เกตุรัตน์ สุขวัจน์ 2539. ปรสิตวิทยาทางการแพทย์: โปรโตซัวและหนอนพยาธิ. 181-185. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ศิริเพ็ญ เวชชากรันย์, อรัญญา ตันติปัญจพร และวิรัช ธรรมวินิจฉัย, 2535. คู่มือหลักสูตรเร่งรัด จุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์สำหรับงานวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. 5-95. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- สาธิต ประเสริฐศรี 2553. โรคไมโครสปอริเดียในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- สุกัญญา ผลิตกุล 2547. การตรวจวินิจฉัยโรค Taura syndrome และ White spot syndrome โดยเทคนิคทางอนุชีววิทยาในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม. . จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- Anantasomboon G, Sriurairatana S, Flegel TW and Withyachumnarnkul B 2006. Unique lesions and viral-like particles found in growth retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* from East Africa. *Aquaculture*. 253(1): 197-203.
- Andreadis TG 1985. Experimental transmission of a microsporidian pathogen from mosquitoes to an alternate copepod host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82(16): 5574-5577.
- Aquacops 1984. Review of ten years of experimental penaeid shrimp culture in Tahiti and New Caledonia (South pacific). *Journal of the World Mariculture Society*. 15(1-4): 73-91.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J and Struhl K 1988. *Current Protocols in Molecular Biology* (1988). New York, Greene and Wiley Interscience Google Scholar.
- Azevedo C 2001. Ultrastructural aspects of a new species, *Vavraia mediterranea* (Microsporidia, Pleistophoridae), parasite of the French Mediterranean shrimp,

- Crangon crangon* (Crustacea, Decapoda). Journal of invertebrate pathology. 78(4): 194-200.
- Azevedo C, Corral L and Vivarès C 2000. Ultrastructure of the microsporidian *Inodosporus octospora* (Thelohaniidae), a parasite of the shrimp *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda). Diseases of aquatic organisms. 41(2): 151-158.
- Barlough J, McDowell T, Milani A, Bigornia L, Slemenda S, Pieniazek N and Hedrick R 1995. Nested polymerase chain reaction for detection of *Enterocytozoon salmonis* genomic DNA in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Diseases of Aquatic Organisms. 23(1): 17-23.
- Baxter KN, Rigdon R and Hanna C 1970. *Pleistophora* sp.(Microsporidia: Nosematidae): a new parasite of shrimp. Journal of Invertebrate Pathology. 16(2): 289-291.
- Bell TAL, Bell DVTA and Lightner DV 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology.
- Boone L 1931. A collection of anomuran and macruran crustacea from the bay of Panama and the fresh waters of the canal zone. In: Anomuran, Macruran crustacea from Panama and canal zone. 137-189.
- Borchardt M and Spencer S 2002. Concentration of Cryptosporidium, microsporidia and other water-borne pathogens by continuous separation channel centrifugation. Journal of applied microbiology. 92(4): 649-656.
- Briggs M, Funge-Smith S, Subasinghe R and Phillips M 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP publication. 10: 92.
- Burge W and Enkiri N 1978. Virus adsorption by five soils. Journal of Environmental Quality. 7(1): 73-76.
- Cali A, Kotler DP and Orenstein JM 1993. *Septata intestinalis* NG, N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. Journal of Eukaryotic Microbiology. 40(1): 101-112.
- Canning EU and Lom J 1986. The microsporidia of vertebrates. Academic Press (London) Ltd.
- Carville A, Mansfield K, Widmer G, Lackner A, Kotler D, Wiest P, Gumbo T, Sarbah S and Tzipori S 1997. Development and application of genetic probes for

- detection of *Enterocytozoon bieneusi* in formalin-fixed stools and in intestinal biopsy specimens from infected patients. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 4(4): 405-408.
- Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, Sriurairatana S and Withyachumnarnkul B 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of aquatic organisms*. 60(2): 89-96.
- Costa AM, Buglione CC, Bezerra FL, Martins PC and Barracco MA 2009. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture*. 291(3): 141-146.
- Dada B and Lindquist W 1979. Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in some public grounds and highway rest areas in Kansas. *Journal of helminthology*. 53(02): 145-146.
- Desportes I, Charpentier YL, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravisse P and Modigliani R 1985. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* ng, n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *The Journal of protozoology*. 32(2): 250-254.
- Didier ES, Didier PJ, Snowden KF and Shadduck JA 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*. 2(6): 709-720.
- Docker M, Devlin R, Richard J, Khattra J and Kent M 1997. Sensitive and specific polymerase chain reaction assay for detection of *Loma salmonae* (Microsporea). *Diseases of Aquatic Organisms*. 29(1): 41-48.
- Dunn A, Hatcher M, Terry R and Tofts C 1995. Evolutionary ecology of vertically transmitted parasites: transovarial transmission of a microsporidian sex ratio distorter in *Gammarus duebeni*. *Parasitology*. 111(S1): S91-S109.
- Dunn AM, Terry RS and Smith JE 2001. Transovarial transmission in the microsporidia. *Advances in parasitology*. 48: 57-100.
- Flegel T and Pasharawipas T 1995. A proposal for typical eukaryotic meiosis in microsporidians. *Canadian journal of microbiology*. 41(1): 1-11.
- Flegel TW 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of invertebrate pathology*. 110(2): 166-173.

- Garcia LS 2002. Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of clinical microbiology*. 40(6): 1892-1901.
- Ghosh K and Weiss LM 2009. Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2009: 1-13.
- Graczyk TK, Conn DB, Lucy F, Minchin D, Tamang L, Moura LNS and DaSilva AJ 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitology Research*. 93(5): 385-391.
- Gubler D 2009. Vector-borne diseases. *Revue scientifique et technique*. 28(2): 583.
- Hester JD, Alan Lindquist H, Bobst AM and SCHAEFER FW 2000. Fluorescent in situ Detection of *Encephalitozoon hellem* Spores with a 6-Carboxyfluorescein-Labeled Ribosomal RNA-Targeted Oligonucleotide Probe. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47(3): 299-308.
- Higgins JA, Trout JM, Fayer R, Shelton D and Jenkins MC 2003. Recovery and detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts from water samples using continuous flow centrifugation. *Water research*. 37(15): 3551-3560.
- Hoffman RM, Wolk DM, Spencer SK and Borchardt MA 2007. Development of a method for the detection of waterborne microsporidia. *Journal of microbiological methods*. 70(2): 312-318.
- Iversen E and Kelly J 1976. Microsporidiosis successfully transmitted experimentally in pink shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*. 27(3): 407-408.
- Iversen E and Van Meter NN 1964. A Record of the Microsporidian, *Thelohania duorara*, Parasitizing the Shrimp, *Penaeus Brasiliensis*. *Bulletin of Marine Science*. 14(4): 549-553.
- Iversen ES and Manning RB 1959. A new microsporidan parasite from the pink shrimp (*Penaeus duorarum*). *Transactions of the American Fisheries Society*. 88(2): 130-132.
- Jedryczka M, Kasprzyk I, Korbas M, Jajor E and Kaczmarek J 2014. Infestation of Polish agricultural soils by *Plasmodiophora brassicae* along the Polish-Ukrainian border. *Journal of Plant Protection Research*. 54(3): 238-241.

- Joshi M and Deshpande J 2011. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*. 2(1): 81-97.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P and Wincker P 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 414(6862): 450-453.
- Koella J, Agnew P and Michalakis Y 1998. Coevolutionary interactions between host life histories and parasite life cycles. *Parasitology*. 116(S1): S47-S55.
- Lee SC, Corradi N, Byrnes EJ, Torres-Martinez S, Dietrich FS, Keeling PJ and Heitman J 2008. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Current Biology*. 18(21): 1675-1679.
- Lehnert SA and Johnson SE 2002. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 133(2): 163-171.
- Leungprasert S and Chanakul P 2010. The Reuse of Shrimp Culture Wastewater Treated by Nitrification and Denitrification Processes. *International Journal of Environmental Science and Development*. 1(5): 371.
- Lightner DV 1985. A review of the diseases of cultured penaeid shrimps and prawns with emphasis on recent discoveries and developments. *Proceedings of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps*, 4-7 December 1984, Iloilo City, Philippines:79-103.
- Lightner DV 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. *CRC handbook of mariculture*. 1: 393-486.
- Lightner DV 1996. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*.
- Lom J, Dyková I and Woo P 1995. Myxosporea (Phylum Myxozoa). *Fish diseases and disorders*. Volume 1: protozoan and metazoan infections.. 97-148.
- Marshall K, STOUT R and Mitchell R 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Microbiology*. 68(3): 337-348.

- Mieli MV, Garcia JJ and Becnel JJ 1998. Horizontal Transmission of *Amblyospora dolosi* (Microsporidia: Amblyosporidae) to the Copepod *Metacyclops mendocinus* (Wierzejski, 1892). *Journal of invertebrate pathology*. 72(3): 330-335.
- Nielsen L, Sang-oum W, Cheevadhanarak S and Flegel TW 2005. Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Diseases of aquatic organisms*. 63(2-3): 101-106.
- Ongerth JE and Stibbs HH 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(4): 672-676.
- Overstreet RM 1973. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. *Aquaculture*. 2: 105-140.
- Pasharawipas T and Flegel T 1994. A specific DNA probe to identify the intermediate host of a common microsporidian parasite of *Penaeus merguensis* and *P. monodon*. *Asian Fish. Sci.* 7(2-3): 157-167.
- Pasharawipas T, Flegel T, Chaiyaroj S, Mongkolsuk S and Sirisinha S 1994. Comparison of amplified RNA gene sequences from microsporidian parasites (*Agmasoma* or *Thelohania*) in *Penaeus merguensis* and *P. monodon*. *Asian Fisheries Science*. 7: 169-178.
- Pulsford A and Matthews R 1991. Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Norway pout, *Trisopterus esmarkii* (Nilsson). *Journal of Fish Diseases*. 14(1): 67-78.
- Reetz J, Rinder H, Thomschke A, Manke H, Schwebs M and Bruderek A 2002. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *International journal for parasitology*. 32(7): 785-787.
- Senanan W, Tangkrock-Olan N, Panutrakul S, Barnette P, Wongwiwatanawute C, Niphonkit N and Anderson DJ 2007. The presence of the Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) in the wild in Thailand. *Journal of Shellfish Research*. 26(4): 1187-1192.
- Smith H 1998. Detection of parasites in the environment. *Parasitology-Cambridge*. 117: S113-S141.

- Smith VJ, Brown JH and Hauton C 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology*. 15(1): 71-90.
- Sprague V 1950. *Thelohania cambari* n. sp., a microsporidian parasite of North American crayfish. *J Parasitol [Suppl]*. 36: 46.
- Stentiford G and Bateman K 2007. *Enterospora* sp., an intranuclear microsporidian infection of hermit crab *Eupagurus bernhardus*. *Diseases of aquatic organisms*. 75(1): 73-78.
- Stentiford G, Bateman K, Longshaw M and Feist S 2007. *Enterospora canceri* n. gen., n. sp., intranuclear within the hepatopancreatocytes of the European edible crab *Cancer pagurus*. *Diseases of aquatic organisms*. 75(1): 61-72.
- Stentiford GD, Feist SW, Stone DM, Bateman KS and Dunn AM 2013. Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends in parasitology*. 29(11): 567-578.
- Sterling C 1990. Waterborne cryptosporidiosis. *Cryptosporidiosis of man and animals*: 51-58.
- Sung H-H, Hsu S-F, Chen C-K, Ting Y-Y and Chao W-L 2001. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. *Aquaculture*. 192(2): 101-110.
- Takvorian PM, Buttle KF, Mannella CA, Weiss LM and Cali A 2006. High-voltage electron microscopy and computerized tomography: New approaches to study microsporidian spore internal organization. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53: S55.
- Tangprasittipap A, Srisala J, Chouwdee S, Somboon M, Chuchird N, Limsuwan C, Srisuvan T, Flegel TW and Sritunyalucksana K 2013. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in white leg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC veterinary research*. 9(139): 1-10.
- Terry R, Dunn A and Smith J 1997. Cellular distribution of a feminizing microsporidian parasite: a strategy for transovarial transmission. *Parasitology*. 115(02): 157-163.

- Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, Bateman KS, Sriurairatana S, Chavadej J, Sritunyalucksana K and Withyachumnarnkul B 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov.(Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of invertebrate pathology*. 102(1): 21-29.
- Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohny LL, Pantoja CR, Fitzsimmons K and Lightner DV 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of aquatic organisms*. 105(1): 45-55.
- Vale T, Dowling M and Cloonan M 1992. Infection and Multiplication of Ross River Virus in the Mosquito Vector *Aedes-Vigilax* (Skuse). *Australian journal of zoology*. 40(1): 35-41.
- Vesey G, Slade J, Byrne M, Shepherd K, Dennis P and Fricker C 1993. Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(1): 87-90.
- Vossbrinck C, Maddox J, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck B and Woese C 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
- Weber R, Schwartz DA and Deplazes P 1999. Laboratory diagnosis of microsporidiosis. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology. 315-362.
- Weiser J 1959. *Nosema laphygmae* n. sp. and the internal structure of the microsporidian spore. *J. Insect Pathol*. 1: 52-59.
- Weiss LM 2001. Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta tropica*. 78(2): 89-102.
- Weiss LM and Vossbrinck CR 1999. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In: *The microsporidia and microsporidiosis*. American Society of Microbiology. 129-171.
- Werren JH and O'Neill SL 1997. *influential passengers*. 1 The evolution of heritable symbionts. Oxford university.1-40.

Yamane T 1967. Statistics: An introductory analysis. 2nd Edition. Harper and Row.
Newyork.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก ข้อมูลการเลี้ยงกุ้ง

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลการเลี้ยงกุ้งของฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา

ฟาร์ม ฉะเชิงเทรา 1	วันที่เริ่มและ สิ้นสุดการเลี้ยง	อายุบ่อ	อัตราการปล่อย กุ้ง	จำนวนตัว/ กิโลกรัม	ปริมาณอาหารที่ ให้
บ่อ 1	28 ธ.ค.2558 - 13 ก.พ. 2559	48 วัน	200,000ตัว/ 4ไร่	121	2 ตัน
บ่อ 2	28 ธ.ค. -13 ก.พ. 2559	48วัน	200,000ตัว/ 4ไร่	135	2 ตัน
บ่อ 3	28 ธ.ค. -13 ก.พ. 2559	48 วัน	200,000ตัว/ 4ไร่	128	2 ตัน

ฟาร์ม ฉะเชิงเทรา 2	วันที่เริ่มและ สิ้นสุดการเลี้ยง	อายุบ่อ	อัตราการปล่อย กุ้ง	น้ำหนักตัว	ปริมาณอาหารที่ ให้
บ่อ 1	1 ม.ค.-19 ก.พ. 2559	50 วัน	150,000ตัว/ 3ไร่	250	1ตัน
บ่อ 2	1 ม.ค.-19 ก.พ. 2559	50 วัน	150,000ตัว/ 3ไร่	227	1ตัน
บ่อ 3	1 ม.ค.-19 ก.พ. 2559	50 วัน	150,000ตัว/ 3ไร่	222	1ตัน

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลการเลี้ยงกุ้งของฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี

ฟาร์ม จันทบุรี1	วันที่เริ่มและสิ้นสุดการเลี้ยง	อายุบ่อ	อัตราการปล่อย กุ้ง	น้ำหนักตัว	ปริมาณอาหารที่ ให้
บ่อ 1	28 ม.ค.-27 มี.ค. 2559	60 วัน	800,000ตัว/7ไร่	39	22ตัน
บ่อ 2	28 ม.ค.- 17 มี.ค.2559	50 วัน	700,000ตัว/7ไร่	100	8 ตัน
บ่อ 3	28 ม.ค.-- 17 มี.ค.2559	50 วัน	800,000ตัว/7ไร่	80	12 ตัน

ฟาร์ม จันทบุรี2	วันที่เริ่มและสิ้นสุดการเลี้ยง	อายุบ่อ	อัตราการปล่อย กุ้ง	น้ำหนักตัว	ปริมาณอาหารที่ ให้
บ่อ 1	25 พ.ย.2558- 13 ม.ค. 2559	50 วัน	600,000ตัว/6ไร่	103	7 ตัน
บ่อ 2	25 พ.ย.- 13 ม.ค. 2559	50 วัน	600,000ตัว/6ไร่	108	7 ตัน
บ่อ 3	25 พ.ย.- 13 ม.ค. 2559	50 วัน	600,000ตัว/6ไร่	109	7 ตัน

ภาคผนวก ข ผลการตรวจคุณภาพน้ำ

ตารางที่ 1 ผลค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งจากฟาร์มฉะเชิงเทรา 1

	บ่อที่ 1	บ่อที่ 2	บ่อที่ 3
การวิเคราะห์ทางกายภาพ			
ความโปร่งแสงของน้ำ (Turbidity)(FAU)	32.5 ± 0.5	32.5 ± 0.5	32.5 ± 0.5
การวิเคราะห์ทางเคมี			
- ความเค็ม (ppt)	2.30 ± 0.58	2.30± 0.58	2.30± 0.58
- ความเป็นกรด ต่าง	8.23 ± 0.51	8.23 ± 0.51	8.23 ± 0.51
- ค่าความเป็นด่าง (Total alkalinity) (มก.ของ CaCO ₃ /ลิตร)	121.67 ± 14.96	117.67 ±12.96	121.67 ±14.96
- ความกระด้าง (Hardness) (มก.ของ CaCO ₃ /ลิตร)	2922 ± 1100	2922± 1100	2922± 1100
- ปริมาณแอมโมเนีย (มก.ของ NH ₃ /ลิตร)	0.5±0.05	0.5±0.05	0.5±0.05

ตารางที่ 2 ผลค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งจากฟาร์มฉะเชิงเทรา 2

	บ่อที่ 1	บ่อที่ 2	บ่อที่ 3
การวิเคราะห์ทางกายภาพ			
ความโปร่งแสงของน้ำ (Turbidity)(FAU)	65.5 ± 0.05	65.5 ± 0.05	65.5 ± 0.05
การวิเคราะห์ทางเคมี			
- ความเค็ม (ppt)	2.10 ± 0.50	2.10 ± 0.50	2.10 ± 0.50
- ความเป็นกรด ต่าง	8.12 ± 0.32	8.12 ± 0.32	8.12 ± 0.32
- ค่าความเป็นด่าง (Total alkalinity) (มก.ของ CaCO ₃ /ลิตร)	125.75 ± 5.96	132.67 ±5.62	122.37 ±6.06
- ความกระด้าง (Hardness) (มก.ของ CaCO ₃ /ลิตร)	2,430 ± 1100	2,430 ± 1100	2,430 ± 1100
- ปริมาณแอมโมเนีย (มก.ของ NH ₃ /ลิตร)	2.0±0.05	2.0±0.05	2.0±0.05

ตารางที่ 3 ผลค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งจากฟาร์มจันทบุรี 1

	บ่อที่ 1	บ่อที่ 2	บ่อที่ 3
การวิเคราะห์ทางกายภาพ			
ความโปร่งแสงของน้ำ (Turbidity)(FAU)	10.5 ± 0.5	10.5 ± 0.5	10.5 ± 0.5
การวิเคราะห์ทางเคมี			
- ความเค็ม (ppt)	30± 0.50	30± 0.50	30± 0.50
- ความเป็นกรด ต่าง	8.10 ± 0.50	8.10 ± 0.50	8.10 ± 0.50
- ค่าความเป็นด่าง (Total alkalinity) (มก.ของ CaCO ₃ /ลิตร)	138.30 ± 15.23	133.34 ±11.16	134.17 ±11.22
- ความกระด้าง (Hardness) (มก.ของ CaCO ₃ /ลิตร)	2,322± 1,000	2,322± 1,000	2,322± 1,000
- ปริมาณแอมโมเนีย (มก.ของ NH ₃ /ลิตร)	0.1±0.05	0.1±0.05	0.1±0.05

ตารางที่ 4 ผลค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งจากฟาร์มจันทบุรี 2

	บ่อที่ 1	บ่อที่ 2	บ่อที่ 3
การวิเคราะห์ทางกายภาพ			
ความโปร่งแสงของน้ำ (Turbidity)(FAU)	20.5 ± 0.5	20.5 ± 0.5	20.5 ± 0.5
การวิเคราะห์ทางเคมี			
- ความเค็ม (ppt)	31.7± 0.50	31.7± 0.50	31.7± 0.50
- ความเป็นกรด ต่าง	8.25 ± 0.31	8.25 ± 0.31	8.25 ± 0.31
- ค่าความเป็นด่าง (Total alkalinity) (มก.ของ CaCO ₃ /ลิตร)	124.63 ± 4.65	164.70 ± 4.23	156.63 ±2.16
- ความกระด้าง (Hardness) (มก.ของ CaCO ₃ /ลิตร)	2,625 ± 1,200	2,625 ± 1,200	2,625 ± 1,200
- ปริมาณแอมโมเนีย (มก.ของ NH ₃ /ลิตร)	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1

ภาคผนวก ค ตารางสรุปผลการตรวจหาเชื้อ *E. hepatopenaei*

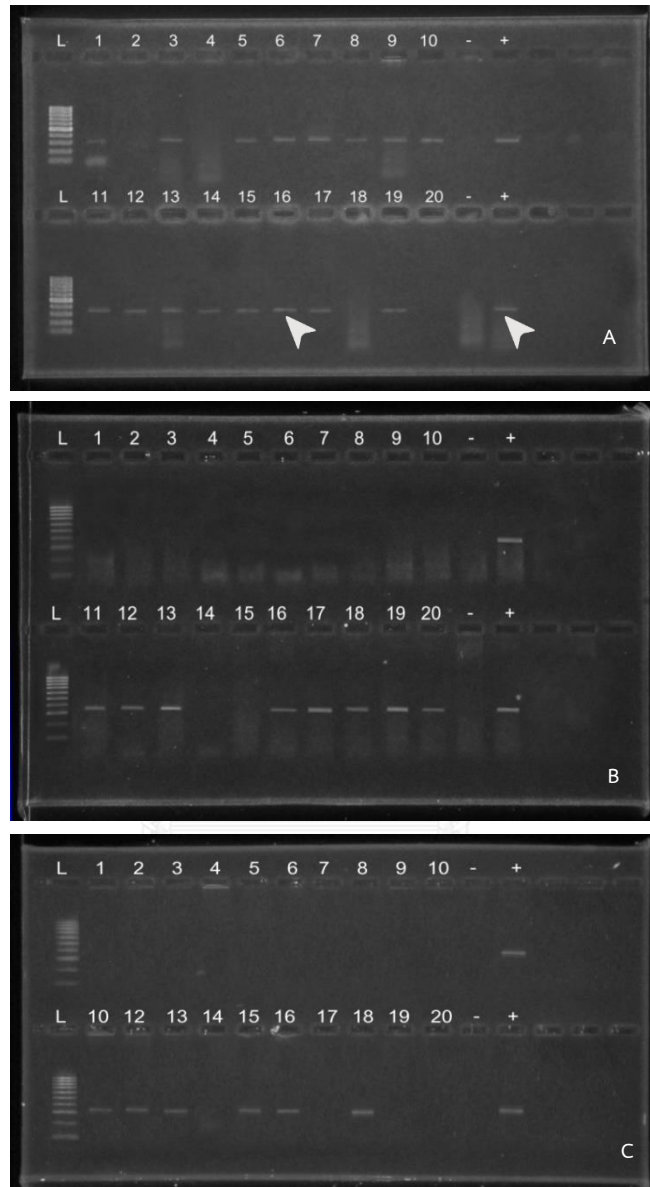
ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจหาเชื้อ *E. hepatopenaei* ในกุ้งขาวก่อนและหลังเลี้ยง รวมทั้งสัตว์พาหะ, ดิน และน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวที่จังหวัดฉะเชิงเทรา

แหล่งตัวอย่าง	บ่อ	ค่าเฉลี่ยความยาว (เซนติเมตร)	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก (กรัม)	กุ้งขาว		ปูนา	กุ้งก้ามกราม	ปลาเทโพ	ปลาช่อน	ปลาหมอ	ปลาช่อน	ดิน		น้ำ
				ก่อน เลี้ยง	หลัง เลี้ยง							ก่อน เลี้ยง	หลัง เลี้ยง	
ฉะเชิงเทรา 1	1	10.0±1.1	8.2±1.0	8/2	8/2	2/8	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5	2/3	0/5
	2	7.8±1.2	7.4±1.0	0/10	8/2	3/7	2/8	0/10	0/10	0/10	0/10	1/4	3/2	0/5
	3	8.6±1.0	7.8±1.0	0/10	6/4	2/8	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	1/4	2/3	0/5
ฉะเชิงเทรา 2	1	6.50±1.4	4.00±2.1	8/2	8/2	3/7	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	2/3	3/2	0/5
	2	7.50±1.6	4.40±2.0	5/5	7/3	2/8	2/8	0/10	0/10	0/10	0/10	1/4	2/3	0/5
	3	6.50±1.7	4.50±2.2	6/4	8/2	3/7	2/8	0/10	0/10	0/10	0/10	1/4	3/2	0/5

ตารางที่ 2 สุนัขผลการตรวจหาเชื้อ *E. hepatoopenaei* ในกึ่งขากก่อนและหลังเลี้ยง รวมทั้งสัตว์พาหะ, ดิน และน้ำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวที่จังหวัดฉะเชิงเทรา

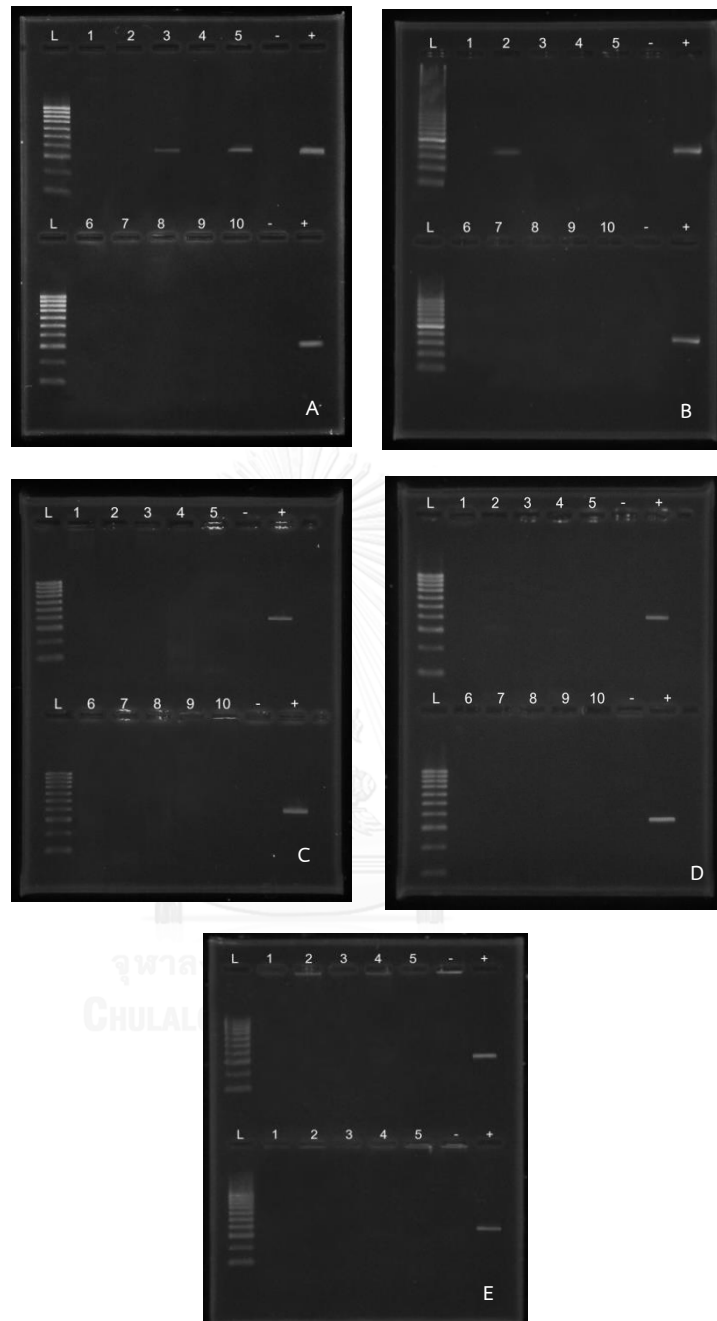
แหล่งตัวอย่าง	บ่อ	ค่าเฉลี่ยความยาว (เซนติเมตร)	ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก (กรัม)	กุ้งขาว		ปู แสม ก้าม แดง	ปู แสม ก้าม แดง	ปลา จู่	ปลาหมอ เทศ	หอยถ่าน	ปู แสบ	หอยชัก าก	ดิน		น้ำ
				ก่อน เลี้ยง	หลัง เลี้ยง								ก่อน เลี้ยง	หลัง เลี้ยง	
จับพบที่ 1	1	15.9±0.5	25.5±0.5	0/10	3/7	2/8	0/10	0/10	0/10	0/10	1/9	0/10	0/5	1/4	0/5
	2	11.30±0.5	10±0.5	0/10	3/7	3/7	2/8	0/10	0/10	0/10	1/9	0/10	0/5	3/2	0/5
	3	12.70±0.5	12.4±0.5	0/10	2/8	2/8	3/7	0/10	0/10	0/10	1/9	0/10	0/5	2/3	0/5
จับพบที่ 2	1	12.6±0.8	9.7±0.8	0/10	4/6	0/10	2/8	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5	2/3	0/5
	2	11.4±0.6	9.2±0.6	0/10	6/4	0/10	3/7	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5	2/3	0/5
	3	11.5±0.7	9.1±0.6	0/10	4/6	0/10	2/8	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/5	3/2	0/5

ภาคผนวก ง ภาพการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei*

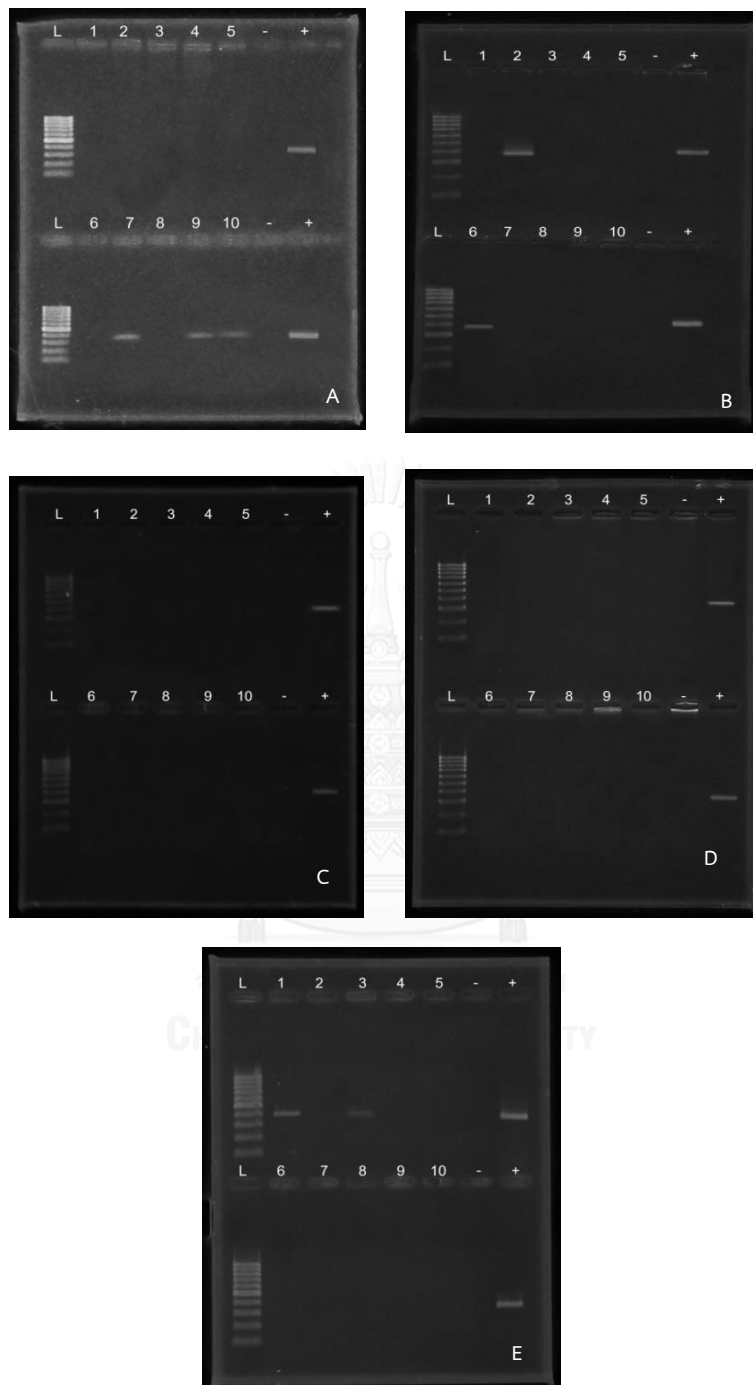


ภาพที่ 1 แสดงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ที่ขนาด 384 bp. (ลูกศรชี้) จากตัวอย่างกุ้งที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 (Lmarker,, - negative control, + positive control)

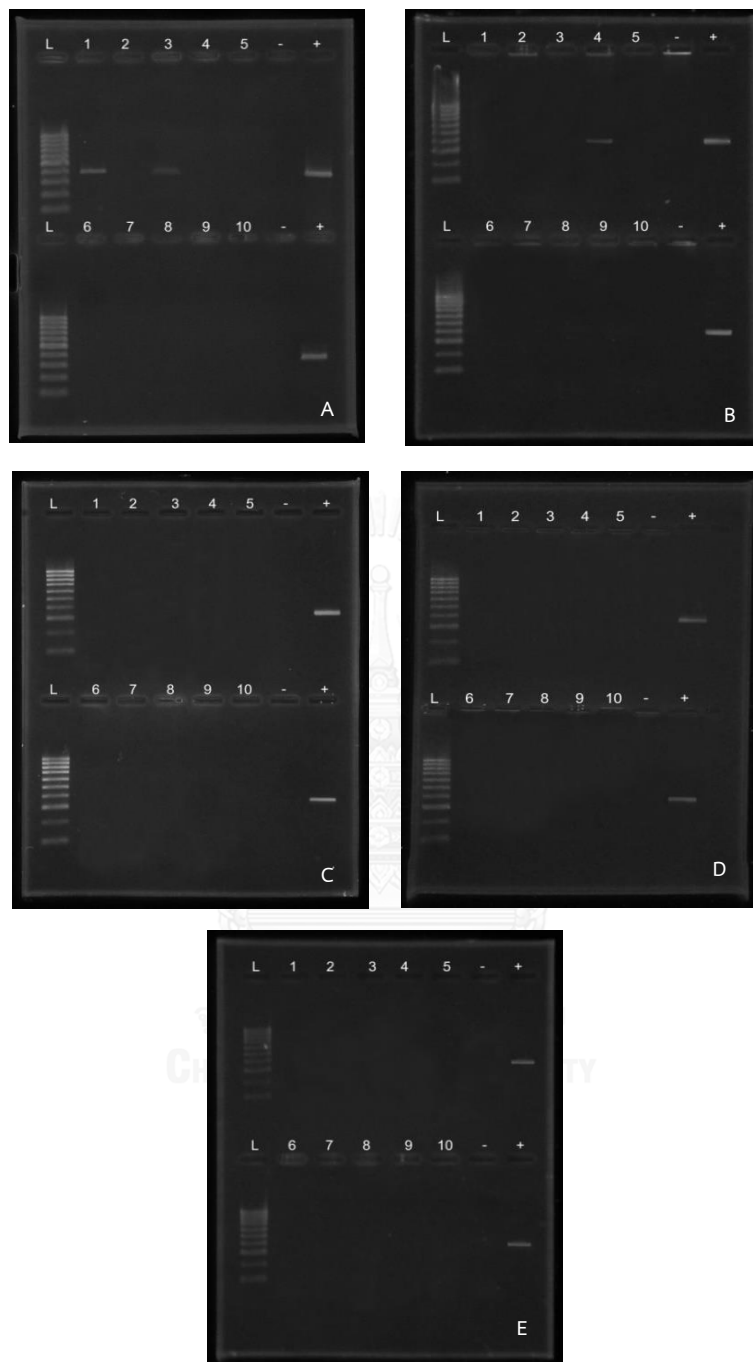
- A) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 1 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- B) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 2 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- C) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 3 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)



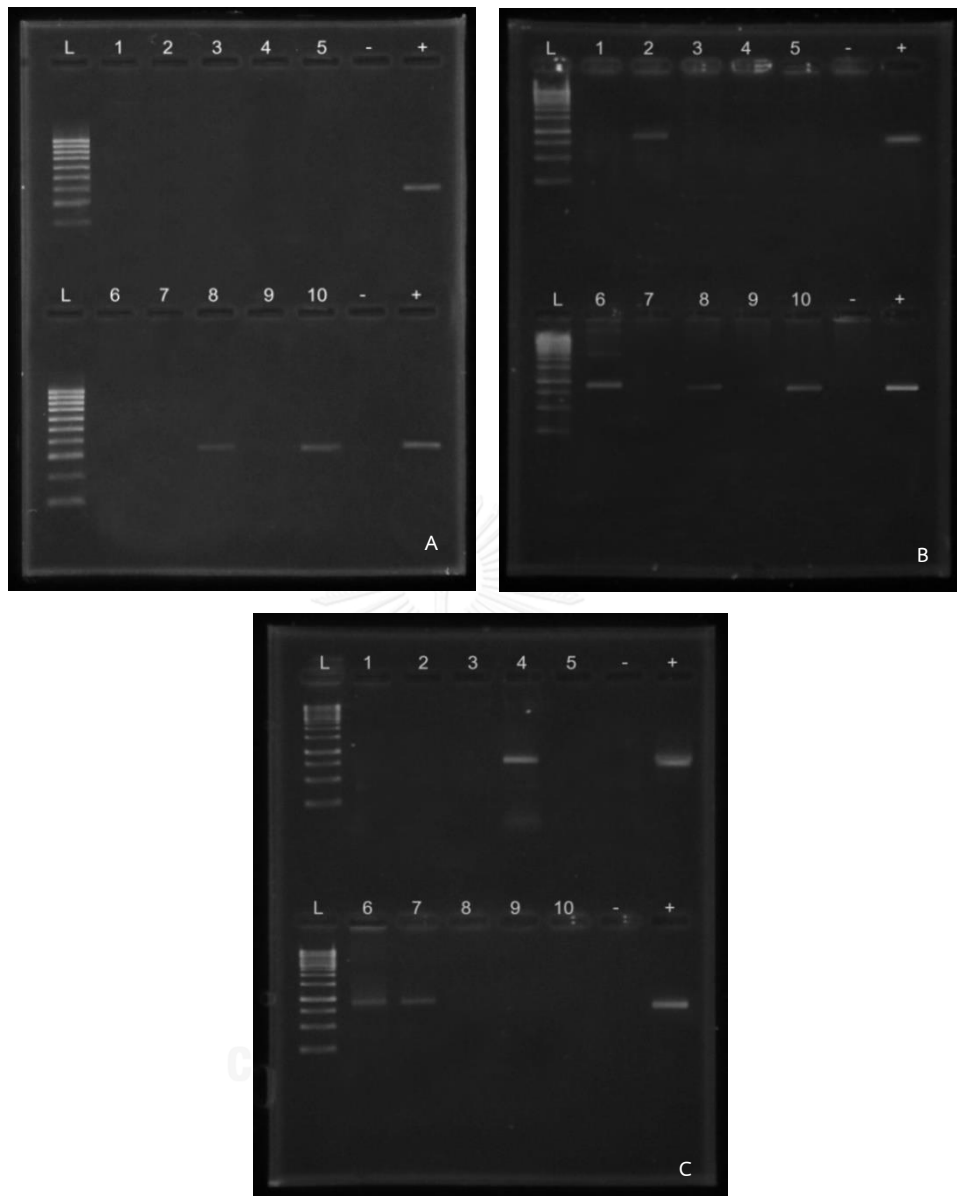
ภาพที่ 2 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 บ่อที่ 1 A) บุนา, B) กุ้งก้ามกราม, C) ปลาकिनยุง, D) หอยโข่ง และ E) ปลานิล



ภาพที่ 3 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 บ่อที่ 2 A) ปูนา, B) กุ้งก้ามกราม, C) ปลาकिनยุง, D) หอยโข่ง และ E) ปลานิล

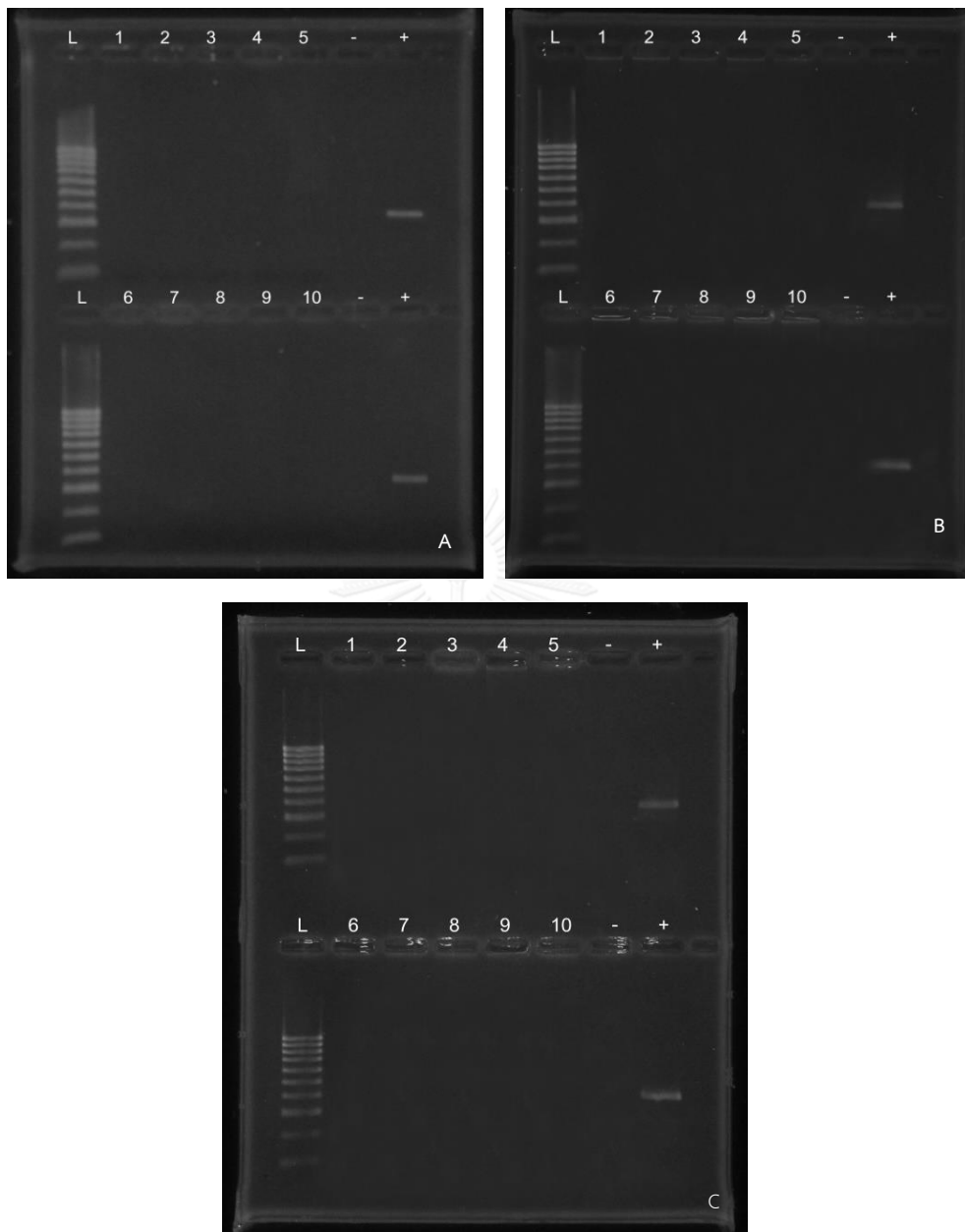


ภาพที่ 4 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 บ่อที่ 3 A) ปูนา, B) กุ้งก้ามกราม, C) ปลาकिनยุง, D) หอยโข่ง และ E) ปลานิล



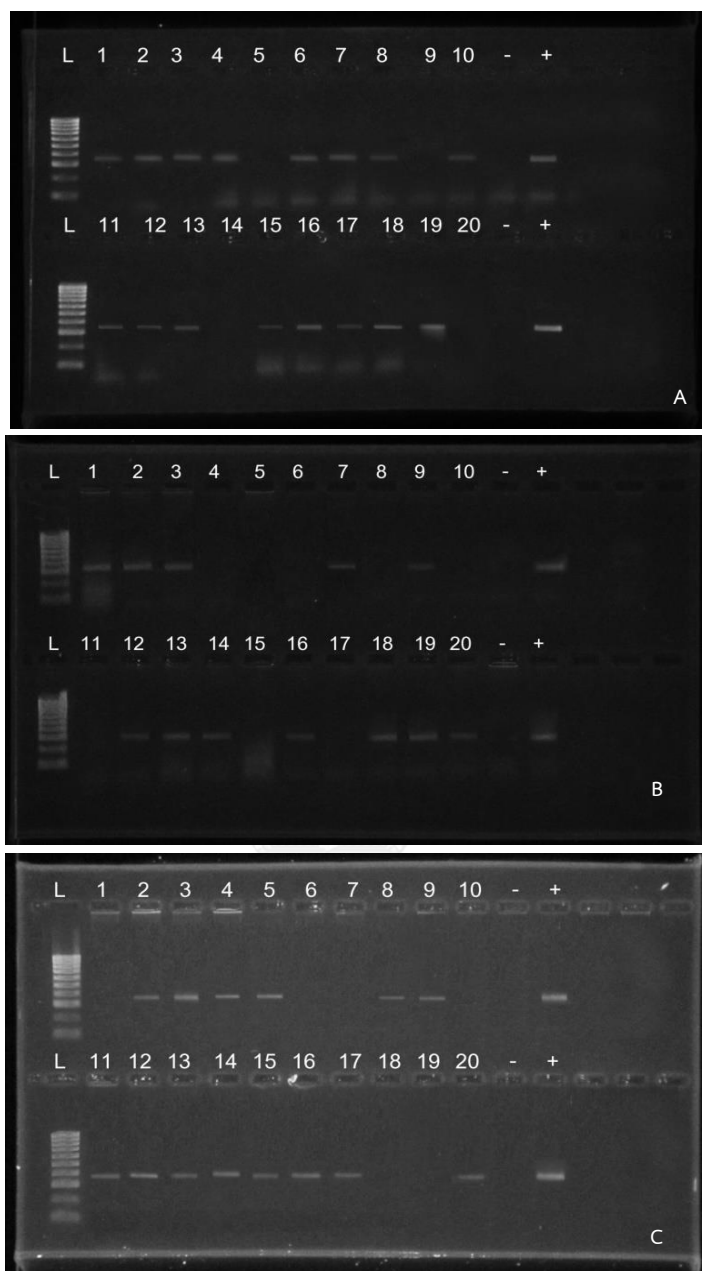
ภาพที่ 5 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 384 bp.ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างดินที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 (Lmarker, - negative control, + positive control)

- A) ตัวอย่างดินบ่อที่ 1 (แถวบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- B) ตัวอย่างดินบ่อที่ 2 (แถวบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- C) ตัวอย่างดินบ่อที่ 3 (แถวบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)



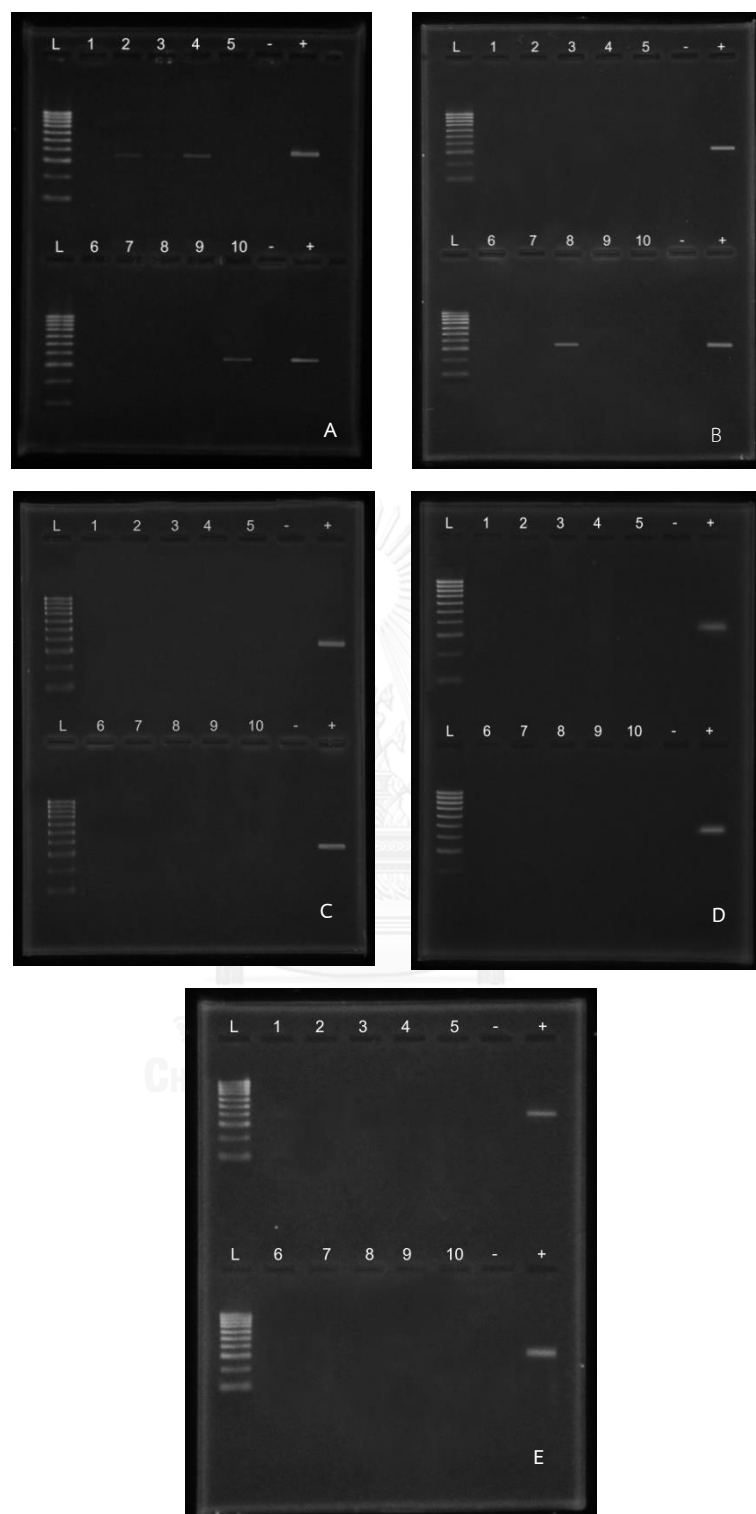
ภาพที่ 6 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 384 bp. ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 (Lmarker, -negative control, +positive control)

- A) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 1 (แถวบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง:ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- B) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 2 (แถวบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง:ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- C) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 3 (แถวบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง:ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

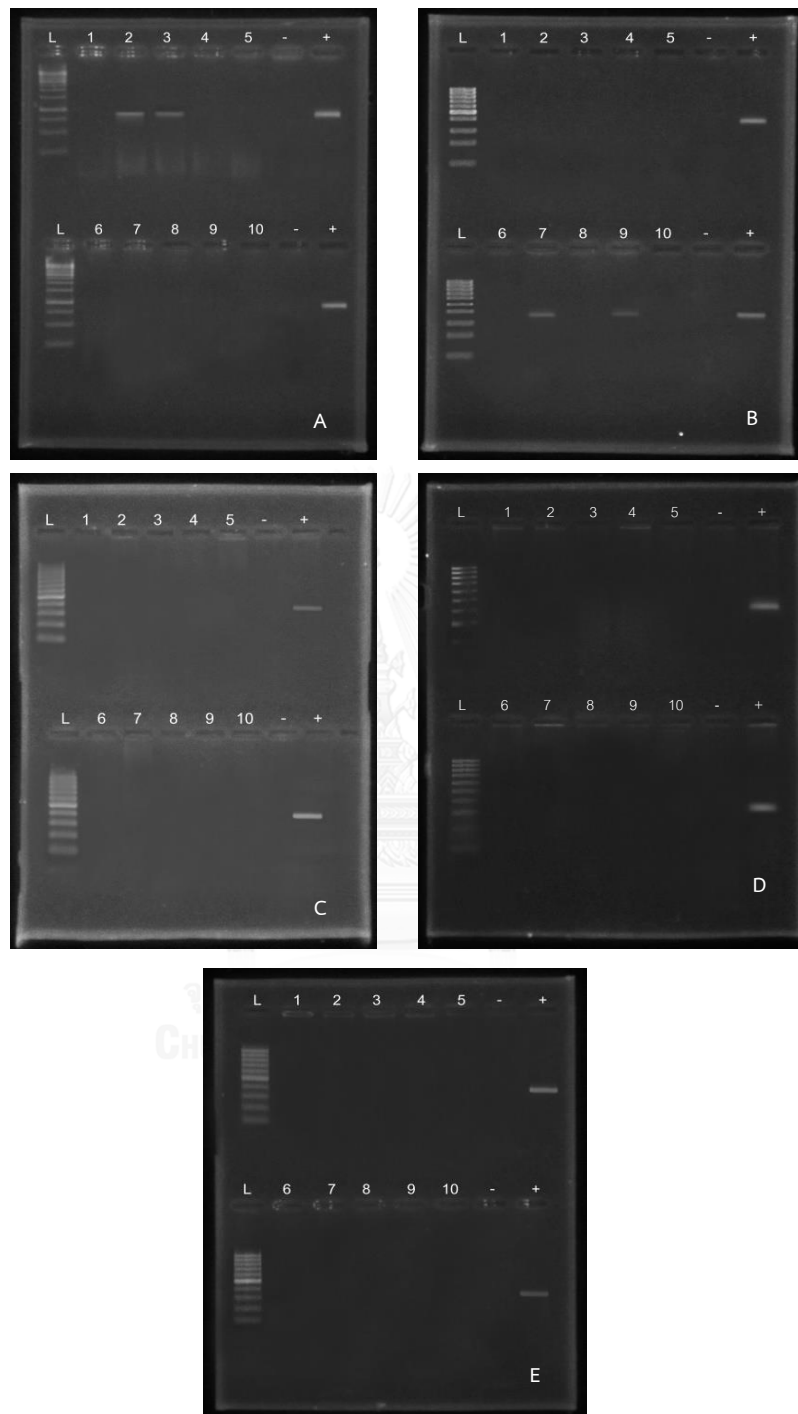


ภาพที่ 7 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 384 bp.ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างกุ้งที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 (Lmarker, -negative control, +positive control)

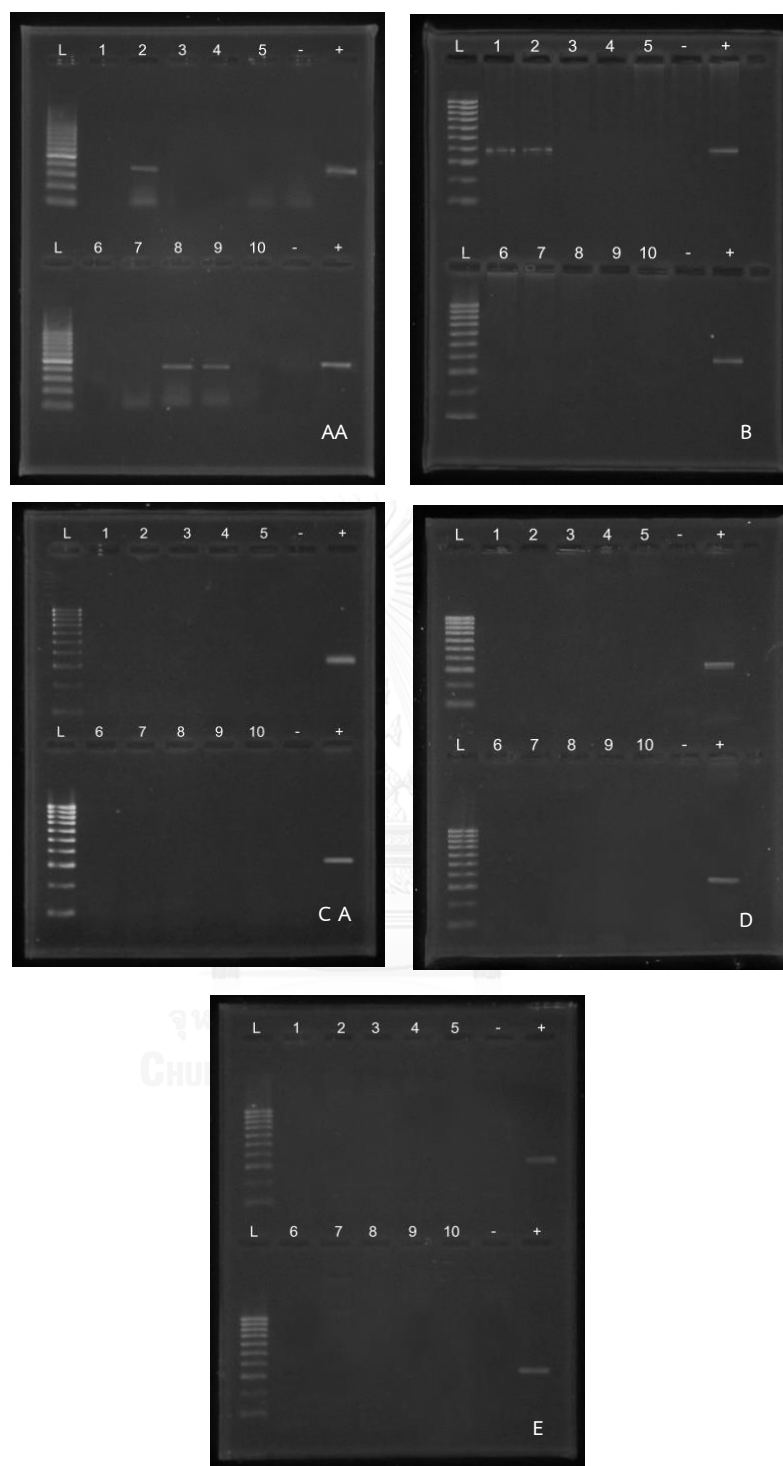
- A) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 1 (แถบบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- B) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 2 (แถบบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- C) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 3 (แถบบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)



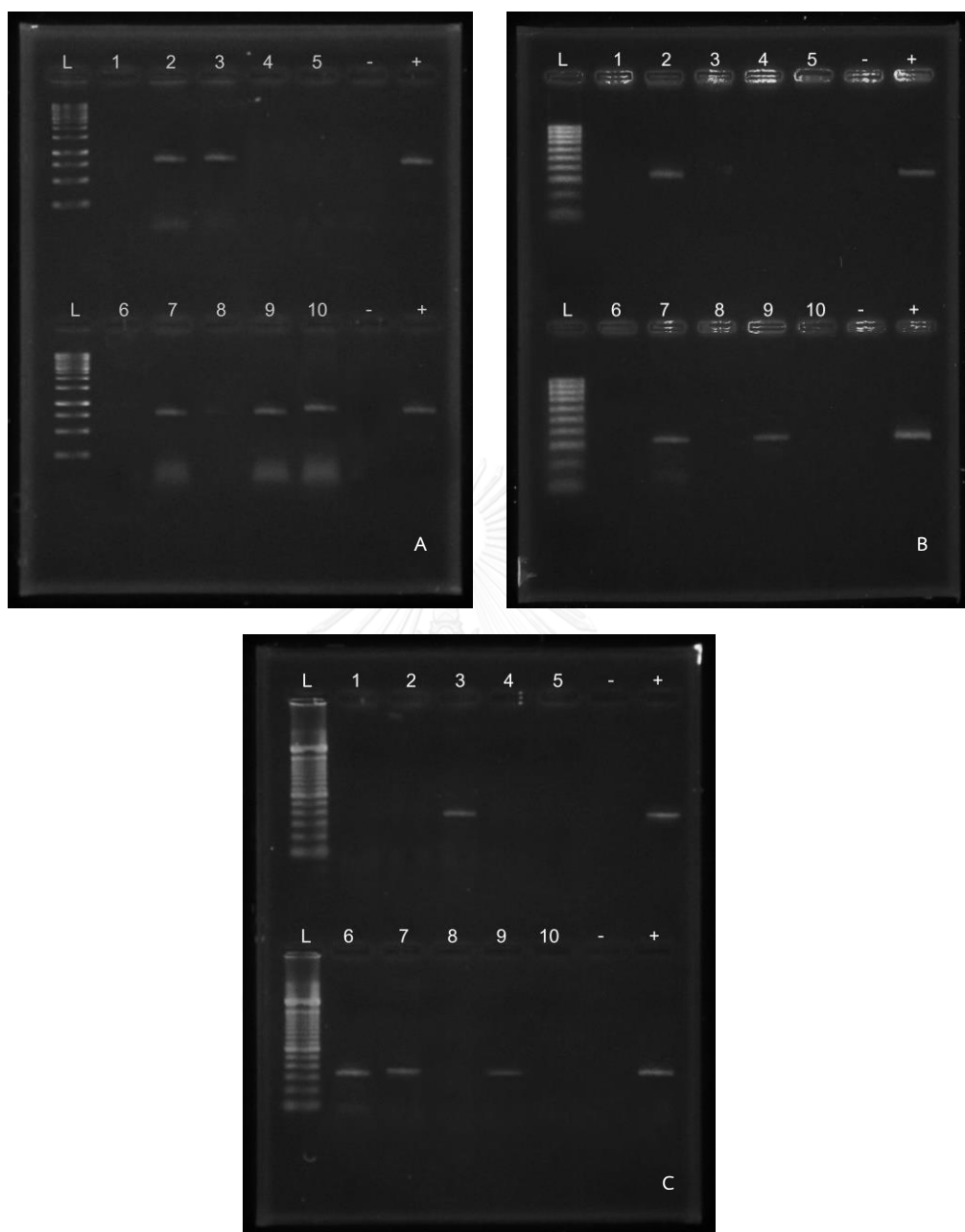
ภาพที่ 8 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่มากจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 บ่อที่ 1 A) ปูนา, B) กุ้งก้ามกราม, C) ปลาकिनยุง, D) ปลาบู๊ไส และ E) ปลานิล



ภาพที่ 9 การปรากฏของแอนติเจนในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 บ่อที่ 2 A) ปูนา, B) กุ้งก้ามกราม, C) ปลาकिनยุง, D) ปลาบู๊ไส และ E) ปลานิล



ภาพที่ 10 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 บ่อที่ 3 A) ปูนา, B) กุ้งก้ามกราม, C) ปลาकिनยุง, D) ปลาบู่ใส และ E) ปลานิล

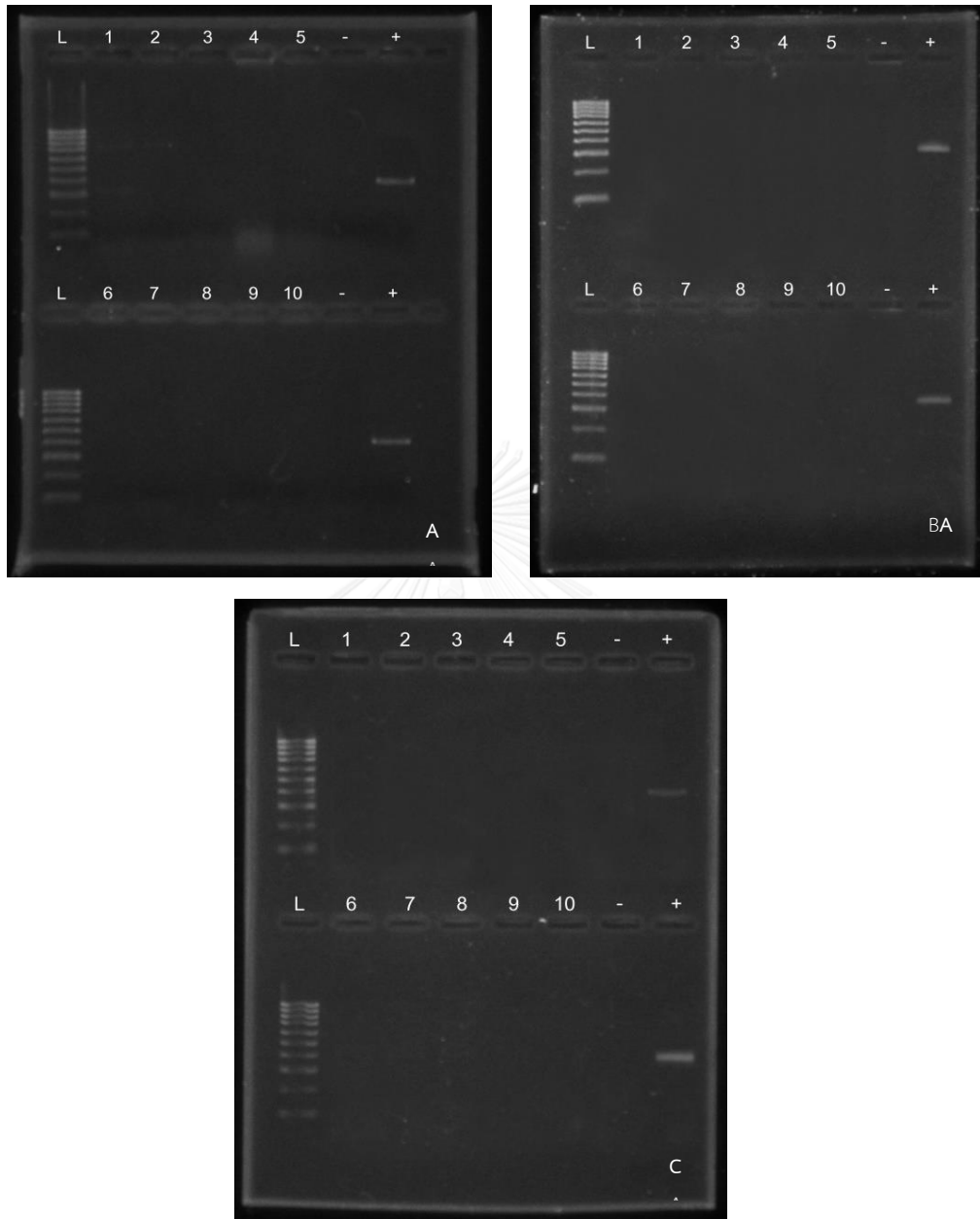


ภาพที่ 11 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ที่ขนาด 384 bp. จากตัวอย่างดินที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 (Lmarker, -negative control, +positive control)

A) ตัวอย่างดินบ่อที่ 1 (แถบบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

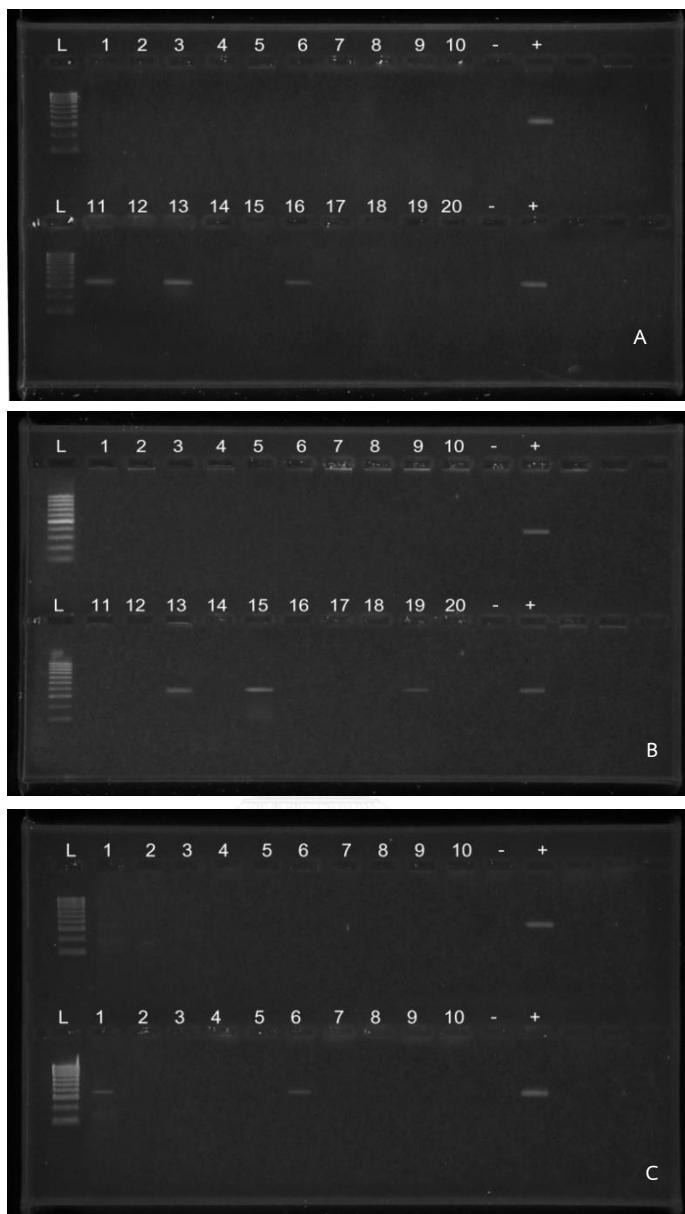
B) ตัวอย่างดินบ่อที่ 2 (แถบบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

C) ตัวอย่างดินบ่อที่ 3 (แถบบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)



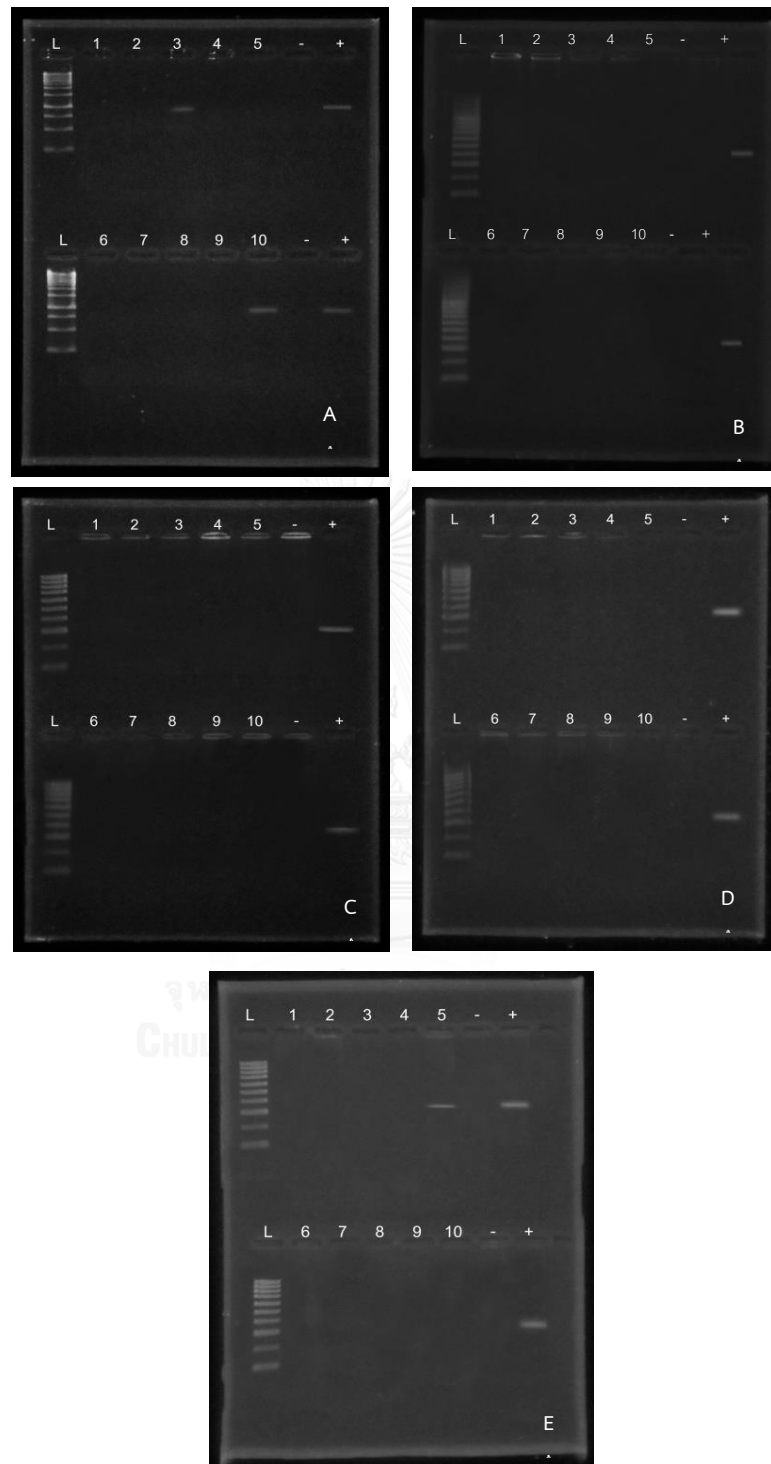
ภาพที่ 12 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 384 bp. ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา 2 (Lmarker, -negative control, +positive control)

- A) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 1 (แถบบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- B) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 2 (แถบบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- C) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 3 (แถบบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

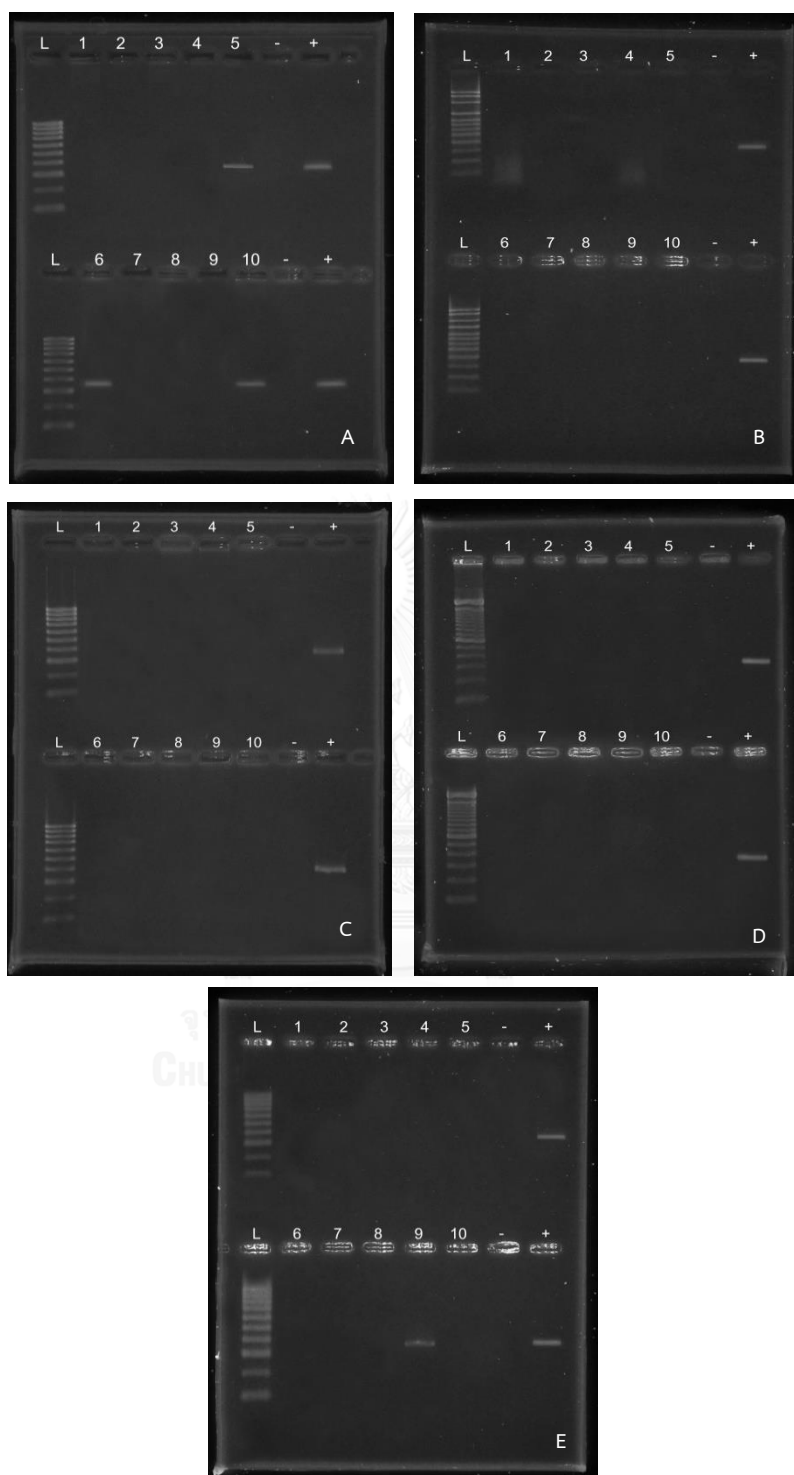


ภาพที่ 13 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอขนาด 384 bp. ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างกุ้งที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1 (Lmarker, -negative control, +positive control)

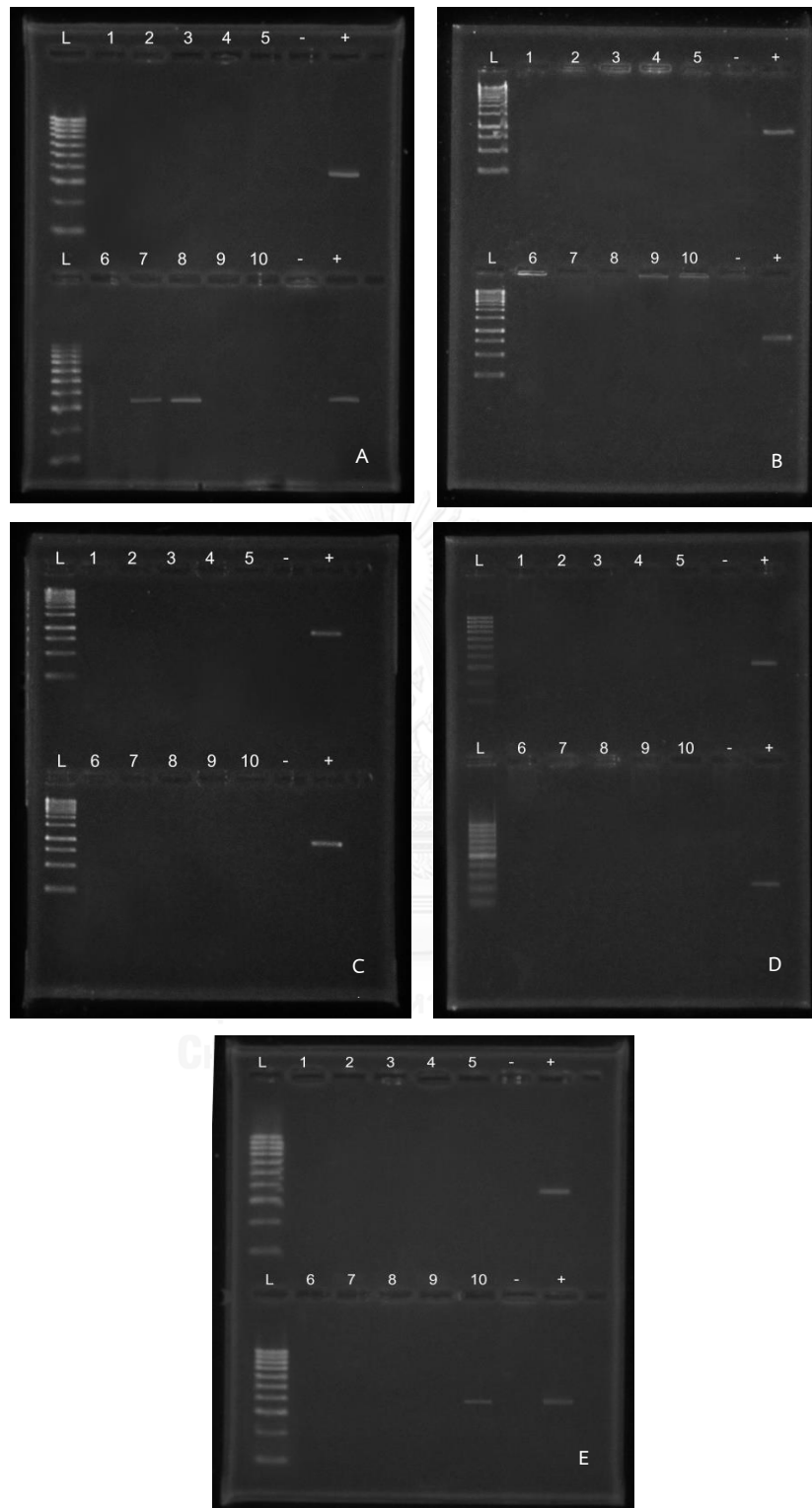
- A) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 1 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- B) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 2 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- C) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 3 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)



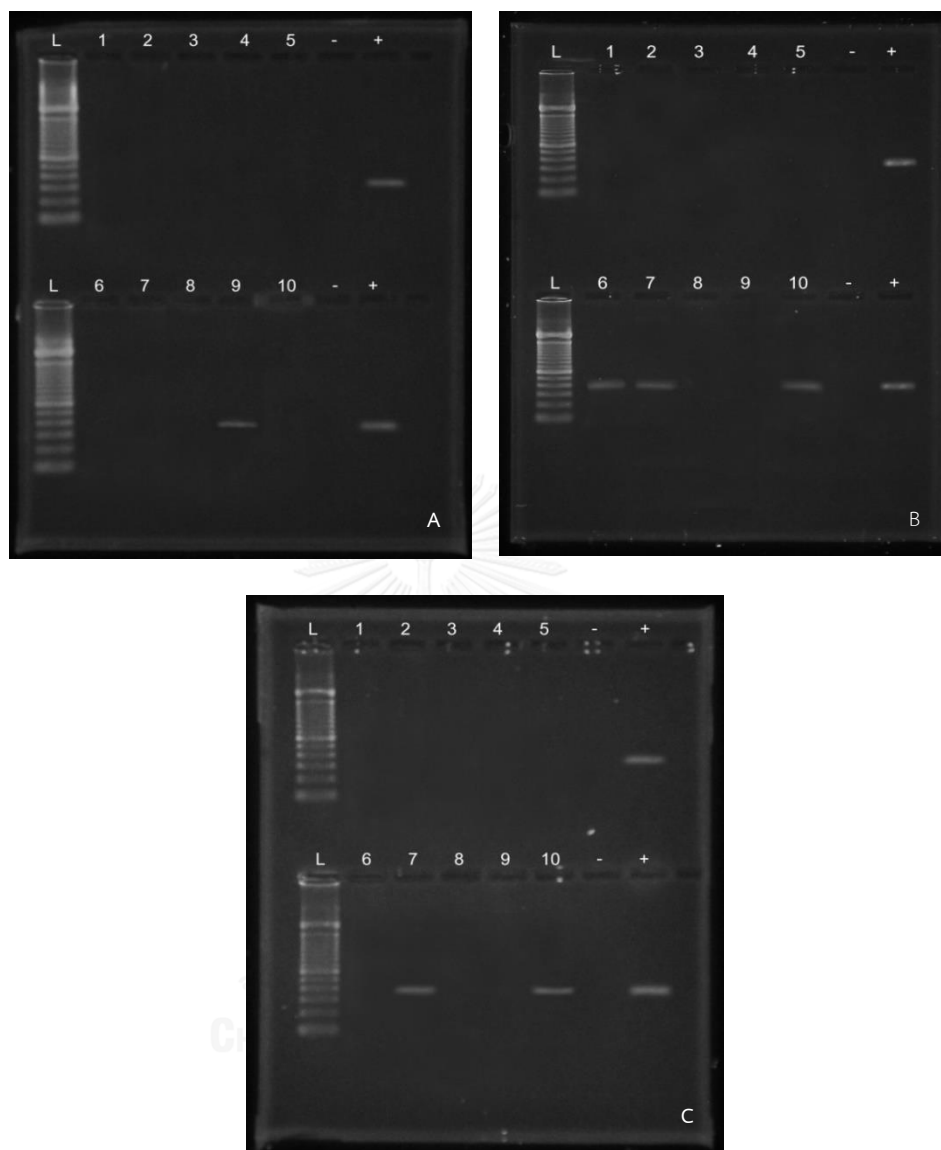
ภาพที่ 14 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1 บ่อที่ 1 A) ปูแสมก้ามม่วง, B) ปลาปู, C) ปลาหมอเทศ, D) หอยถ่าน และ E) ปูแป้น



ภาพที่ 15 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1 บ่อที่ 2 A) ปูแสมก้ามม่วง, B) ปลาบู๋, C) ปลาหมอเทศ, D) หอยถ่าน และ E) ปูแป้น



ภาพที่ 16 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาด ใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1 บ่อที่ 3 A) ปูแสมก้ามม่วง, B) ปลาปู, C) ปลาหมอเทศ, D) หอยถ่าน และ E) ปูแป้น

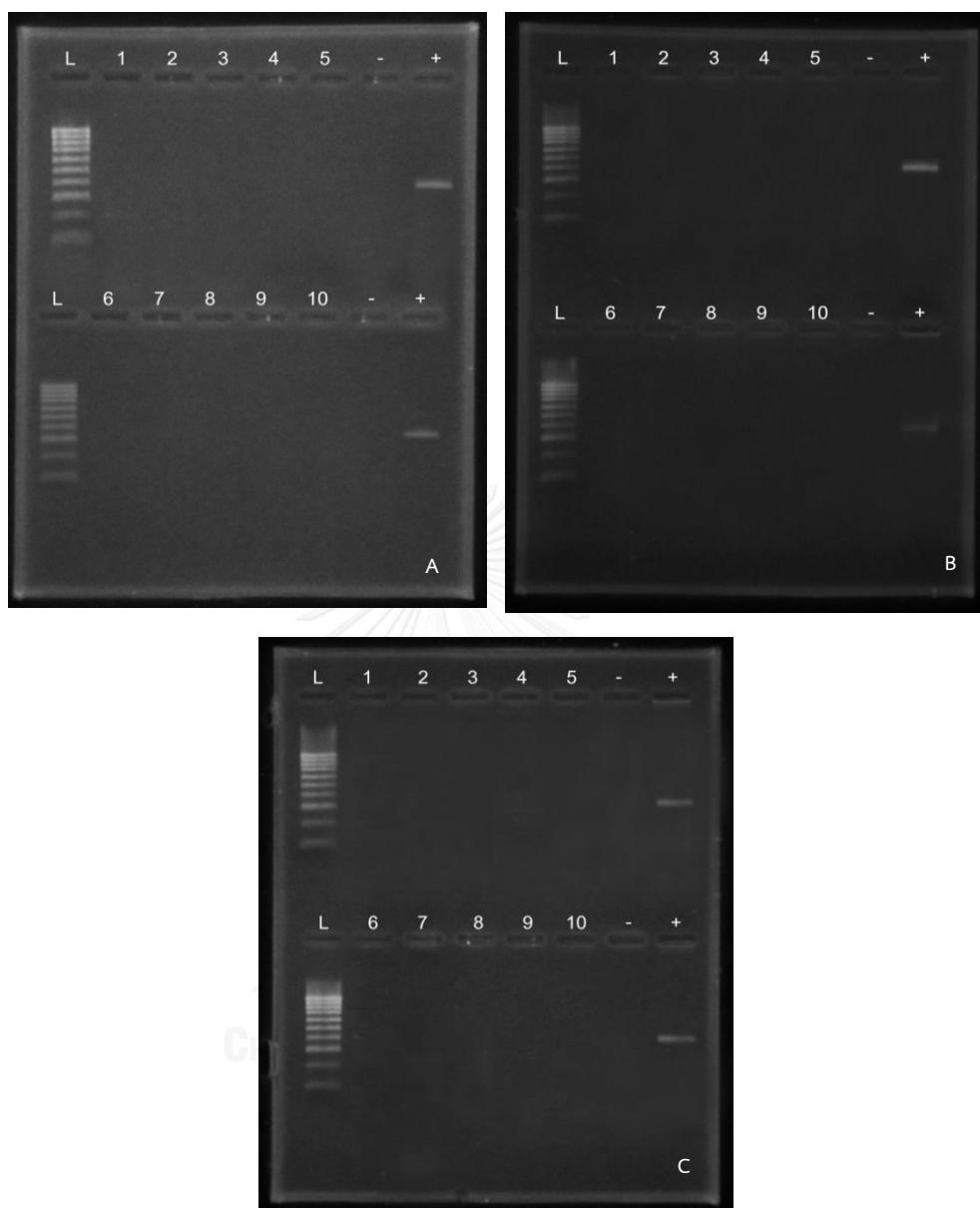


ภาพที่ 17 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 384 bp. ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างดินที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1 (Lmarker, -negative control, +positive control)

A) ตัวอย่างดินบ่อที่ 1 (แถวบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

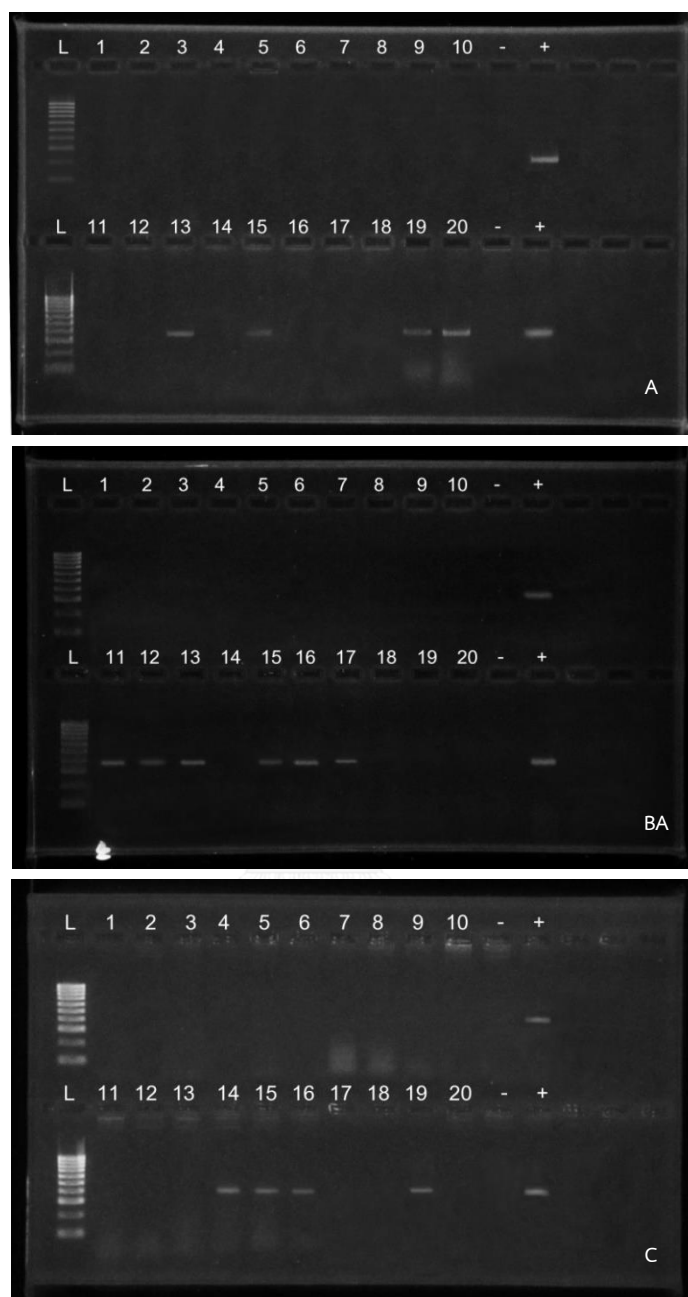
B) ตัวอย่างดินบ่อที่ 2 (แถวบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

C) ตัวอย่างดินบ่อที่ 3 (แถวบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)



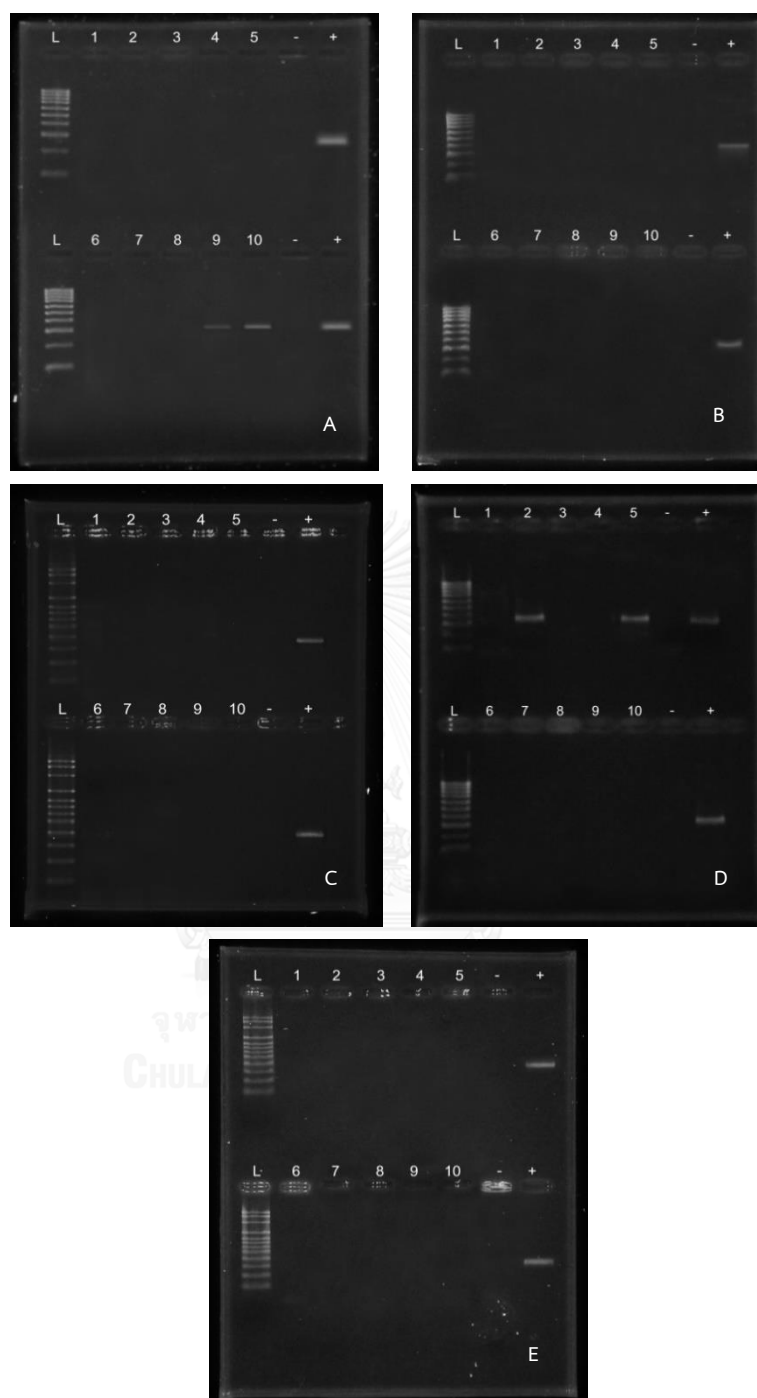
ภาพที่ 18 แสดงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 384 bp. ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 1 (Lmarker, -negative control, +positive control)

- A) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 1 (แถวบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- B) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 2 (แถวบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- C) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 3 (แถวบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

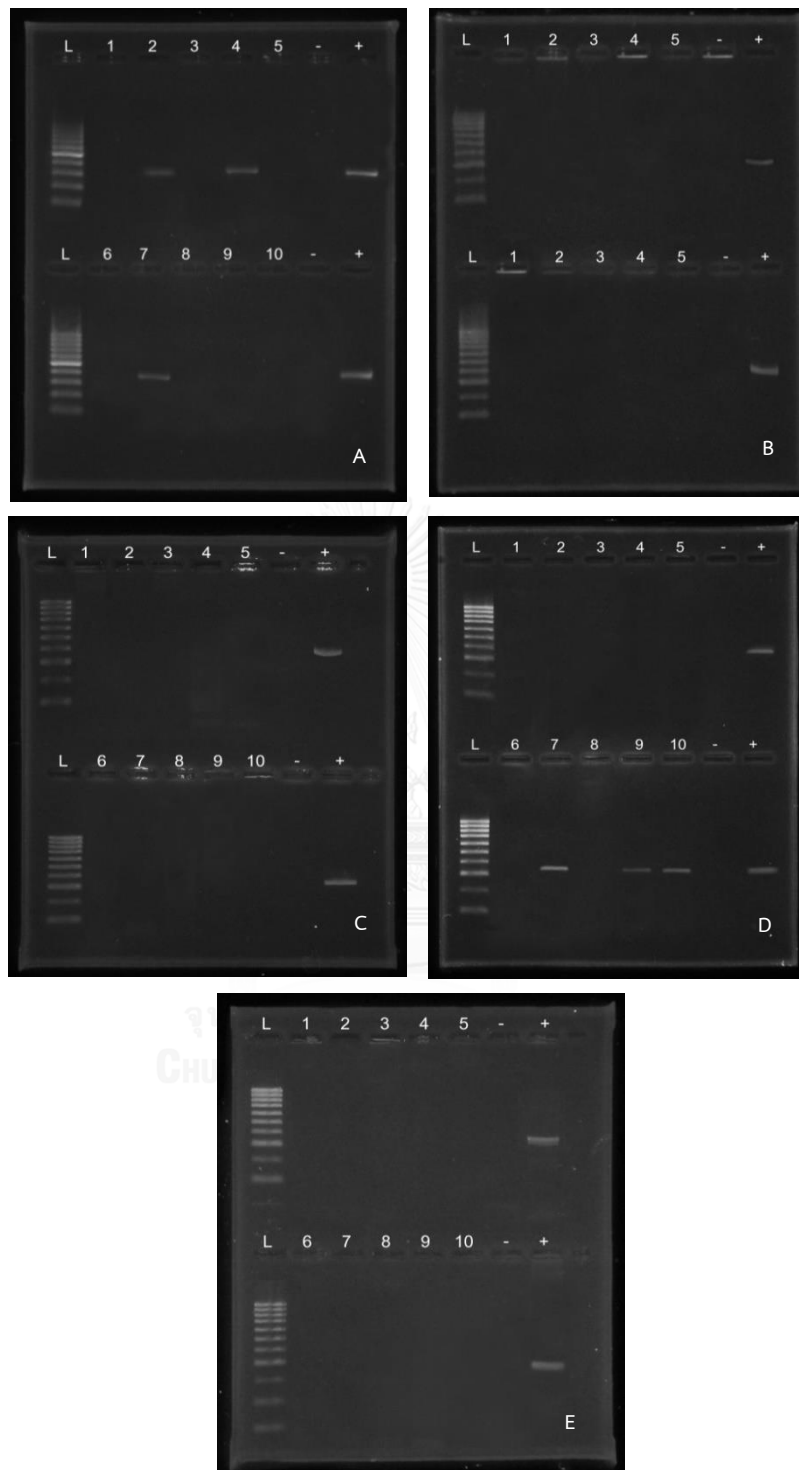


ภาพที่ 19 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 384 bp. ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างกุ้งที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2 (Lmarker, -negative control, +positive control)

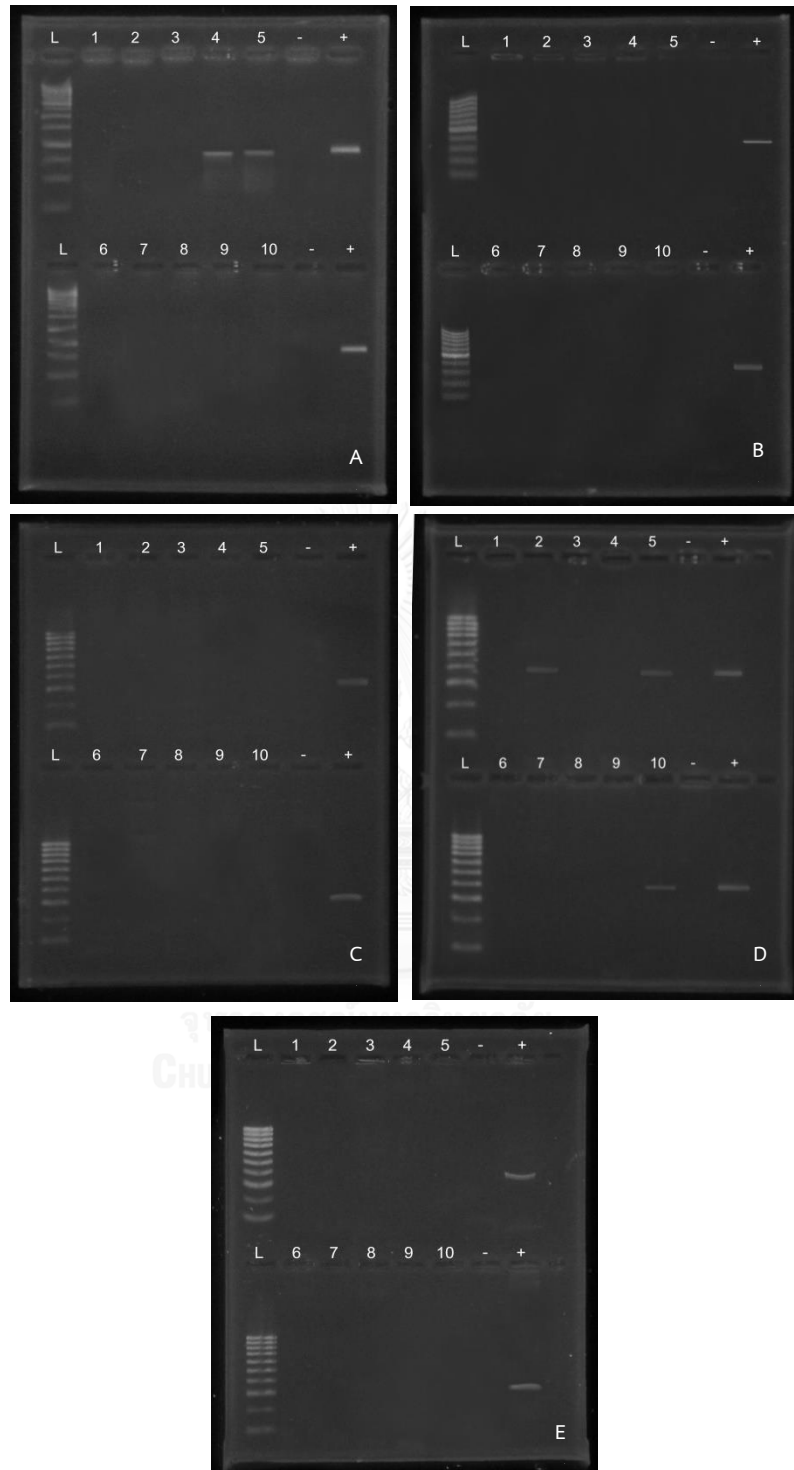
- A) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 1 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- B) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 2 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)
- C) ตัวอย่างกุ้งบ่อที่ 3 (แถวบน: ตัวอย่างกุ้งก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างกุ้งหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)



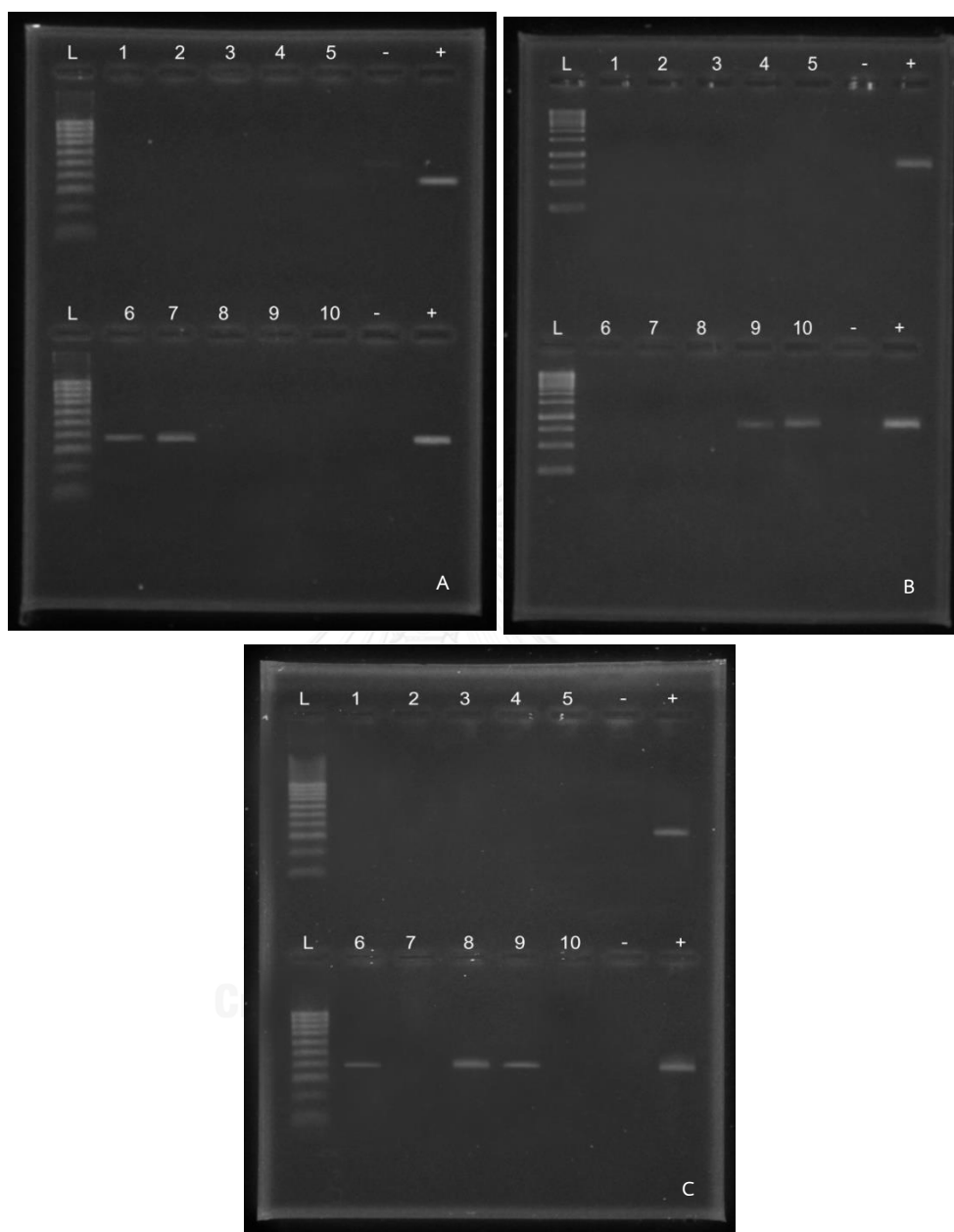
ภาพที่ 20 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2 บ่อที่ 1 A) ปูแสมก้ามแดง, B) ปลาปู, C) ปลาตึกแตนหิน, D) ปูแป้น และ E) หอยขี้กา



ภาพที่ 21 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่จากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2 บ่อที่ 2 A) ปูแสมก้ามแดง, B) ปลาบู่, C) ปลาดุกแตงหิน, D) ปูแป้น และ E) หอยขี้กา



ภาพที่ 22 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* ในตัวอย่างสัตว์น้ำขนาดใหญ่มากจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2 บ่อที่ 3 A) ปูแสมก้ามแดง, B) ปลาบู่, C) ปลาดุกแทนหิน, D) ปูแป้น และ E) หอยขี้กา

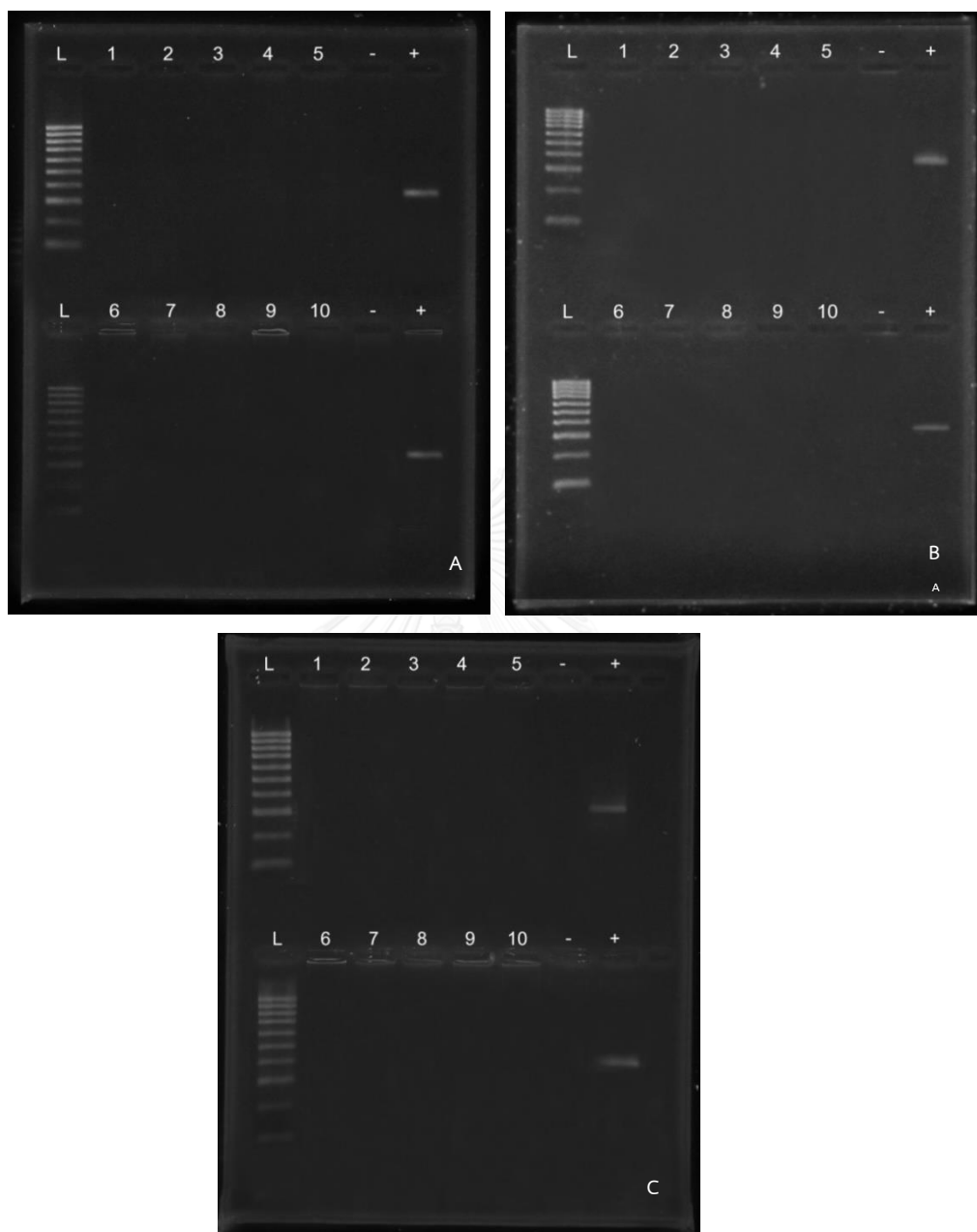


ภาพที่ 23 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 384 bp. ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างดินที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2 (Lmarker, -negative control, +positive control)

A) ตัวอย่างดินบ่อที่ 1 (แถบบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

B) ตัวอย่างดินบ่อที่ 2 (แถบบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

C) ตัวอย่างดินบ่อที่ 3 (แถบบน: ตัวอย่างดินก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างดินหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)



ภาพที่ 24 การปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ขนาด 384 bp. ในการตรวจเชื้อ *E. hepatopenaei* จากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากฟาร์มในจังหวัดจันทบุรี 2 (Lmarker, -negative control, +positive control)

A) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 1 (แถบบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

B) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 2 (แถบบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

C) ตัวอย่างน้ำบ่อที่ 3 (แถบบน: ตัวอย่างน้ำก่อนการเลี้ยง; แถวล่าง: ตัวอย่างน้ำหลังสิ้นสุดการเลี้ยง)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย พิชานนต์ จีรังสุวัต เกิดวันที่ 19 เดือนมกราคม พ.ศ. 2529 จังหวัด กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับมัธยมจากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) เมื่อปีพ.ศ. 2547 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร เมื่อปีพ.ศ.2553 มีความสนใจในด้านสัตวน้ำจึงเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555

