

การเกิดโรค และการแพร่กระจายของเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) ในกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในภาคใต้ของประเทศไทย

จรีพร เรืองศรี¹ นพรัตน์ แทนมาก² นรสิงห์ เพ็ญประไพ³ และ กิจการ สุภมาตย์⁴

Abstract

Ruang Sri, J.¹, Tanmark, N.², Penprapai, N.³ and Supamattaya, K.²
Epizootic and pathogenesis of Taura syndrome virus (TSV) in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultured in southern Thailand
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(5) : 1263-1274

A research study was carried out on Taura syndrome virus (TSV) in *P. monodon* and *P. vannamei* cultured in earthen ponds of Songkhla, Satun and Pattani provinces. Infection rates of 38.33 and 34.21% were detected in *P. monodon* and *P. vannamei*, respectively. The injection of Taura virus isolated from the infected specimens of both species in 3-5 g *P. monodon* juveniles then reared in seawater with 3.25 and 5.74 mg DO for a 15-d period. The mortality rates of 16.67 and 30% were recorded in shrimps injection with TSV solution and reared in 5.74 mg DO seawater, while mortality increased to 50-70% when reared in 3.25 mg DO seawater. TSV infected *P. monodon* showed aggregated multifocal necrotic foci in epithelial tissues

¹Faculty of Technology Management, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani, 84100 Thailand. ²Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand. ³Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Trang campus, Trang.

¹วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะเทคโนโลยีและการจัดการ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เขตการศึกษาสุราษฎร์ธานี 84100 ²วท.บ. (วาริชศาสตร์) นักวิชาการประมง ⁴Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Disease) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 ³วท.ม (วิทยาศาสตร์การประมง) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง จังหวัดตรัง

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

รับต้นฉบับ 31 ตุลาคม 2549 รับลงพิมพ์ 27 เมษายน 2550

of subcuticle, stomach, haemopoietic tissue and to lesser extent in gill, tegmental and antennal glands. Application of in situ hybridization technique with DNA probes to examine the target organ of TSV showed specificity of infection for subcuticle, epithelial tissues of stomach, intestine and haematopoietic tissue is major target organ of infection, with densely dispersed inclusion bodies and multifocal necrotic foci. Penetration of TSV into the cells can cause damage to tissue of antennal gland, gill, lymphoid organ, subcuticle and connective tissue, remarkably noted of no infection in hepatopancreas, nervous tissue, anterior midgut cecum and epicardium tissue.

Key words : Epizootic, pathogenesis, Taura syndrome virus, TSV, Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*

บทคัดย่อ

จรีพร เรืองศรี นพรัตน์ แท่นมาก นรสิงห์ เพ็ญประไพ และ กิจการ สุขมัตย์
การเกิดโรค และการแพร่กระจายของเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) ในกุ้งกุลาดำ
ที่เพาะเลี้ยงในภาคใต้ของประเทศไทย

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(5) : 1263-1274

ศึกษาการระบาดของโรค Taura syndrome virus (TSV) ในกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวที่เลี้ยงบ่อดิน เขตจังหวัด สงขลา สตูล และปัตตานี พบเชื้อดังกล่าวมีการแพร่กระจายอยู่ในกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวคิดเป็น 33.33 และ 34.21% ตามลำดับ การติดเชื้อ TSV ในกุ้งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม โดยวิธีการฉีดสารละลายไวรัสจากแหล่งเชื้อที่แยกจาก กุ้งกุลาดำและกุ้งขาวป่วย และเลี้ยงภายใต้สภาวะของน้ำทะเลที่มีออกซิเจนละลายน้ำ 3.25 มก./ลิตร และ 5.79 มก./ ลิตร นาน 15 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับเชื้อจากแหล่งเชื้อที่แยกจากกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวป่วยมีอัตราการตาย 16.67 และ 30% ตามลำดับ หลังเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีออกซิเจนละลายน้ำ 5.79 มก./ลิตร และมีอัตราการตายสูงขึ้นเป็น 50 และ 70% ตามลำดับ หากเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีออกซิเจนละลายน้ำเพียง 3.25 มก./ลิตร การศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส TSV พบเซลล์มีเซลล์ตายหนาแน่นในเนื้อเยื่อบุผิวส่วนต่าง ๆ ทั้งเนื้อเยื่อผิวได้เปลือก (subcuticular epithelial tissue) เนื้อเยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (stomach epithelial tissue) เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissue) แต่พบได้น้อยในเนื้อเยื่อเหงือก (gill) เซลล์ในต่อมได้เปลือก (tegmental gland) และต่อม โคนหนวด (antennal gland) การตรวจสอบอวัยวะเป้าหมายของเชื้อ TSV ในกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิค *in situ hybridization* ด้วยดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) ที่มีความจำเพาะ พบว่าเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ กือเนื้อเยื่อได้เปลือก เนื้อเยื่อ บุผิวกระเพาะอาหาร เยื่อบุผิวลำไส้ เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักของเชื้อ TSV โดยพบเซลล์ตาย และอินคลูชันบอดีของเซลล์ที่ติดเชื้อกระจายมาก และพบว่าเชื้อไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์และทำลายเนื้อเยื่อในต่อม โคนหนวด เหงือก ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) ต่อมได้เปลือก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แต่ ไม่พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เซลล์ของระบบประสาทเนื้อเยื่อหัวใจ และลำไส้ส่วน ชีก็ม

จากกรณีเกิดปัญหาต่างๆ ในระบบการเพาะเลี้ยงกุ้ง กุลาดำตลอดระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา ทั้งปัญหาการระบาดของ โรคต่างๆ ทั้งโรคที่มีความรุนแรงสูงเช่นโรคไวรัสตัวแดง ดวงขาว (จีราพร และคณะ, 2538) โรคไวรัสหัวเหลือง (Limsuwan, 1991) โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* spp. (จรีพร และคณะ, 2546) โรคติดเชื้อที่มีความรุนแรงต่ำซึ่งมี

ผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง เช่น โรคติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี และไวรัสเอชพีวี (Chotikachinda et al., 2005) ปัญหา การผลิตที่ต้องใช้ต้นทุนสูงเนื่องจากต้องใช้สารเคมี ยา และ สารปฏิชีวนะต่างๆ รวมทั้งต้องใช้ระยะเวลาการเลี้ยงนานขึ้น ประกอบกับปัญหาราคาคงต่ำ ทำให้ผู้ประกอบการเพาะเลี้ยง กุ้งทะเลในประเทศไทยพยายามหาสัตว์น้ำชนิดใหม่เข้ามาเลี้ยง

ทดแทนเพื่อแก้ปัญหาต่างๆ ข้างต้น และหนึ่งในสัตว์น้ำที่ถูกเลือกมาทดแทนกุ้งกุลาดำคือกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ซึ่งมีแหล่งกำเนิดในอเมริกากลาง โดยกรมประมงได้อนุญาตให้เอกชนนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวจากแหล่งต่างๆ คือสหรัฐอเมริกา จีน มาเลเซีย และได้หวัน ตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2545 จนถึงกลางปี พ.ศ. 2546 รวมหลายครั้ง และพ่อแม่พันธุ์ที่ถูกนำเข้ามาจะได้รับการตรวจสอบและกักกันโรคจากหน่วยงานของกรมประมง และนำไปเพาะเลี้ยงยังโรงเพาะที่ได้มาตรฐานเมื่อพิจารณาการแพร่กระจายของโรคชนิดเดียวกันในพื้นที่ประจำถิ่นของกุ้งขาวพบว่ามียารายงานการติดเชื้อชนิดนี้ในกุ้งขาวตั้งแต่ปี 1991 โดยได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งของอเมริกาทั้งในสหรัฐเท็กซัส ฟลอริดา และฮาวาย และลาตินอเมริกา โดยเฉพาะในประเทศเม็กซิโก มากกว่า 1 พันล้านเหรียญ (Brock *et al.*, 1996) รวมทั้งพบว่าเชื้อไวรัสมีการแพร่กระจายลงสู่กุ้งชนิดต่างๆ ในแหล่งน้ำธรรมชาติทั้งกุ้ง *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. aztecus* และ *P. setiferus* (Lightner *et al.*, 1997) นอกจากนี้เชื้อ TSV มีการแพร่กระจายและก่อให้เกิดโรคระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่เนี่ยสในพื้นที่ต่างๆ ของทวีปอเมริกาใต้ทั้งในเอกวาดอร์ เปรู โคลัมเบีย เอลซัลวาดอร์ กัวเตมาลา บราซิล และนิการากัว (Lightner *et al.*, 1994; Lightner, 1996; Brock, 1997; Lightner *et al.*, 1997; Currie, 1998; Vallejo and Newmark, 1999; Bondad *et al.*, 2001; Zarain and Ascencio, 2001) และในกุ้งขาวที่นำมาเลี้ยงในเอเชียที่จีนและไต้หวัน (Yu and Song, 1999)

สำหรับในประเทศไทยนั้นพบว่าเชื้อ TSV ก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เนื่องจากผลการสำรวจการแพร่กระจายของเชื้อ TSV ในกุ้งขาวที่เลี้ยงในประเทศไทยตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2546 ถึงต้นปี พ.ศ. 2547 พบเชื้อไวรัสแพร่กระจายในกุ้งขาวทั้งในลูกกุ้งจากโรงเพาะฟัก และกุ้งในบ่อดิน ของพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ (Sukrakanchana *et al.*, 2005) และในต้นช่วงปลายปี พ.ศ. 2547 ถึงช่วงกลางปี พ.ศ. 2548 พบว่ากุ้งกุลาดำที่มีอายุตั้งแต่ประมาณ 1 เดือน จนถึงขนาดจับจำหน่าย ที่ทำการเพาะเลี้ยงในบ่อดินบริเวณ อ.ระโนด จ.สงขลา มีการติดเชื้อและทยอยตายอย่างต่อเนื่อง โดยกุ้งที่เกิดโรคและตายมีลักษณะตัวซีดเปลือกนึ่ม มีแผลดำตามเปลือกและเนื้อเยื่อได้เปลือก ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่สัมพันธ์กับอาการของกุ้งขาว

ที่ติดเชื้อ TSV ผลการตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธี RT-PCR พบว่ากุ้งที่ตายมีการติดเชื้อ TSV และบางตัวอย่างพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว หรือแบคทีเรียหรือทั้ง 2 ชนิดร่วมด้วย จากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าเชื้อ TSV ที่แอบแฝงมากับกุ้งขาวที่นำเข้ามาเลี้ยงในประเทศมีการแพร่กระจายและก่อให้เกิดในกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจประจำถิ่นได้ ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงระดับการแพร่กระจายของโรคในระบบการเพาะเลี้ยง และความรุนแรงของเชื้อ TSV ในกุ้งกุลาดำ การศึกษาครั้งนี้จึงทำการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวในบ่อเลี้ยงเพื่อตรวจสอบการแพร่กระจายของโรค รวมทั้งทำการแยกเชื้อ TSV เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำในห้องปฏิบัติการ ซึ่งข้อมูลที่ได้คาดว่าจะมีประโยชน์ในการวางแผนเฝ้าระวัง ควบคุม ป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ TSV ลงสู่ระบบนิเวศ และควบคุมการระบาดของโรคนี้ในระบบการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยให้รัดกุมมากขึ้น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวในพื้นที่เลี้ยงที่มีการระบาดของโรค

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงที่มีรายงานการระบาดของโรค TSV คือบ่อเลี้ยงบริเวณ อ.ระโนด จ.สงขลา อ.ละงู และอ.ทุ่งหว้า จ.สตูล และบริเวณ อ.เมือง จ.ปัตตานี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 - พฤษภาคม 2548 รวม 18 บ่อ และตัวอย่างกุ้งขาวที่ทำการเลี้ยงในพื้นที่ต่างๆ ข้างต้นจำนวน 38 บ่อ โดยจัดเก็บตัวอย่างกุ้งเป็น ใกล้เคียง หรือตายใหม่ๆ บ่อละ 10-20 ตัว แขน้ำแข็งแล้วนำเข้าสู่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา วัดปริมาตรออกซิเจนละลายน้ำ ตรวจสอบแพลงก์ตอนชนิดเด่นๆ ในน้ำเลี้ยง และบันทึกลักษณะของสีน้ำ และสภาพบ่อที่เก็บตัวอย่างกุ้ง

การตรวจสอบการติดเชื้อ TSV และเชื้อ *Vibrio* spp.

ตัวอย่างกุ้งแต่ละบ่อนำมาตรวจสอบการติดเชื้อ *Vibrio* spp. และการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิดคือเชื้อ TSV และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว การตรวจสอบเชื้อ TSV ทำโดยแยก

เอาหัวใจ ต่อมาน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อได้เปลือกจากกุ้งแต่ละบ่อ 5-10 ตัว นำมารวมกัน และสุมตัวอย่างประมาณ 200 มก. นำมาสกัด RNA โดยวิธีของ Sambrook และ Russel (2001) ละลาย RNA ด้วยน้ำ deionized ที่เติม DEPC 0.01% และนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 90°C เป็นเวลา 5 นาที เชนในน้ำแข็งทันที แล้วนำไปเพิ่มปริมาณ RNA ของเชื้อ TSV โดยใช้ไพรเมอร์ คือ 5'-TCA ATG AGA GCT TGG TCC-3' และ 3'-AAG CGC GGC TCT ACT-5' (Nunan et al., 1998) ในสารละลายที่มีส่วนประกอบของไพรเมอร์แต่ละเส้น 10 μ M, dNTPs 20 mM, MgCl₂ 50 mM, MMLV 100 unit, Taq DNA polymerase 0.75 unit และเติม RNA ของตัวอย่างที่ผ่านการทำให้เสียสภาพแล้ว 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งโปรแกรมไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที และเพิ่มปริมาณ cDNA 40 รอบโดยเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94°C นาน 45 วินาที 60°C นาน 45 วินาที 72°C นาน 45 วินาที และให้เกิดการสังเคราะห์สาย cDNA ที่สมบูรณ์ที่ 72°C นาน 7 นาที แล้วแยกหาท่อน cDNA ที่เพิ่มปริมาณแล้วด้วยอิเล็กโทรโพรซิซิสใน agarose gel 1.5% ย้อมด้วยเฮททีเดียมโบรไมด์ เข้มข้น 0.05 มก./มล จึงนำไปตรวจสอบผลด้วยเครื่อง UV-visualizer

ตรวจสอบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้ไพรเมอร์ 5'-GAC AGA GAT ATG CAC GCC AA-3' และ 3'-ACC AGT GTT TCG TCA TGG AG-5' ที่รายงานใน Takahashi และคณะ (1996) แยกหัวใจ ต่อมาน้ำเหลือง กล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาว และสุมมาประมาณ 200 มก. เพื่อสกัด DNA โดยวิธีของ Sambrook และ Russel (2001) ละลาย DNA ด้วยน้ำ deionized แล้วนำไปเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองโดยเตรียมสารละลายที่มีส่วนประกอบของไพรเมอร์แต่ละเส้น 1 μ M, dNTPs 200 mM, MgCl₂ 50 mM, Taq DNA polymerase 2.5 unit และ DNA ของตัวอย่าง 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งโปรแกรมไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 3 นาที และนำไปเพิ่มปริมาณ 30 รอบ โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 96°C นาน 30 วินาที 56°C นาน 30 วินาที 72°C นาน 30 วินาที และให้เกิดการสังเคราะห์สาย DNA ที่สมบูรณ์ที่ 60°C นาน 7 นาที แล้วแยกหาท่อน DNA ที่เพิ่มปริมาณแล้วด้วยอิเล็กโทรโพรซิซิส ใน agarose gel 1.5% ย้อมด้วยเฮททีเดียมโบรไมด์

เข้มข้น 0.05 มก./มล ตรวจสอบแถบผลด้วยเครื่อง UV-visualizer

ตรวจสอบการติดเชื้อ *Vibrio* spp. โดยใช้ลูปเขี่ยเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนตัวอย่างกุ้งแต่ละบ่อๆ ละ 6 ตัว นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt (TCBS) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม. ตรวจสอบการเจริญของเชื้อและบันทึกผล

การทดสอบการเกิดโรค และความรุนแรงของเชื้อ TSV ในกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำปกติอายุ 40-50 วัน (ขนาด 3-5 กรัม) จำนวน 600 ตัว จากบ่อเลี้ยงของเกษตรกรที่ไม่มีประวัติการระบาดของเชื้อ TSV รวมทั้งผ่านการตรวจสอบยืนยันว่าไม่ติดเชื้อ TSV โดยวิธี RT-PCR นำมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ที่บรรจุน้ำทะเล 5 ตัน เตรียมสีและคุณภาพน้ำโดยเติมปูนโดโลไมท์เพื่อปรับค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ให้อยู่ในช่วง 80-120 มก./ลิตร pH ในช่วง 7.5-8.5 เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดประมาณ 7 วัน เพื่อปรับสภาพ และทดสอบการเกิดโรค TSV จากแหล่งเชื้อที่แยกจากกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวปวย ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเชื้อเริ่มต้นใกล้เคียงกันคือ 12.12 และ 12.36 มก./มล ตามลำดับ แล้วเจือจางเชื้อ TSV ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS, pH 7.4) เป็น 10⁻¹ - 10⁻⁵ เก็บเชื้อที่เจือจางในน้ำแข็ง นำไปฉีดกุ้งกุลาดำบริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่ 6 ตัวละ 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 20 ตัว ชุดควบคุมฉีดสารละลาย PBS ในปริมาณเท่ากัน แบ่งกุ้งที่ฉีดเชื้อ และกุ้งชุดควบคุมออกเป็น 2 ชุดๆ ละ 10 ตัว ลงเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 250 ลิตร ที่เติมน้ำ 200 ลิตร ชุดแรกเลี้ยงในสภาวะที่เดิมออกซิเจนส่วนชุดที่ 2 เลี้ยงในน้ำที่ไม่เติมออกซิเจน ให้อาหารเม็ดแก่กุ้งทั้ง 2 ชุดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำ ทำความสะอาดตู้ บันทึกการตาย เป็นเวลา 15 วัน และนำตัวอย่างกุ้งที่ตายหลังการติดเชื้อมาตรวจยืนยันสาเหตุการตายโดยวิธี RT-PCR และตรวจสอบการติดเชื้อ *Vibrio* spp. โดยเฉพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS

การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเซลล์ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ TSV

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำปวย และยืนยันผลติดเชื้อ TSV

โดยวิธี RT-PCR จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณ อ.ระโนด จ.สงขลา จำนวน 2 บ่อ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกขนาดในบ่อๆ ละ 10-15 ตัว นำมาฉีดน้ำยาเดวิดสันให้ทั่วตัวและเก็บรักษาสภาพในน้ำยาชนิดเดิม นำมาเตรียมตัวอย่างเป็นสไลด์ถาวรเพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) กล้ามเนื้อ (muscle) ต่อมมน้ำเหลือง (lymphoid organ) หัวใจ ต่อมใต้เปลือก (tegmental gland) เนื้อเยื่อประสาท (nerve tissue) และ ต่อมโคนหนวด (antennal gland) โดยวิธีของ Bell และ Lightner (1988) โดยนำตัวอย่างที่เก็บรักษาสภาพมาตัดแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่ากันตามยาวลำตัว และตัดแต่งเนื้อเยื่อ เป็นชิ้นขนาด 1-2 ตร.ซม. แล้วดึ่งน้ำออกจากชิ้นเนื้อโดยใช้แอลกอฮอล์ แล้วนำพาราฟาสต์เข้าในชิ้นเนื้อฝังในพาราฟาสต์ จากนั้นจึงนำมาตัดตามยาวโดยใช้ไมโครโทมให้เนื้อเยื่อหนา 3-4 ไมโครเมตร ย้อมสีฮีมาท็อกซียลีนและอีโอซิน (H&E; Humason, 1979) ตรวจสอบผลโดยการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ในอวัยวะส่วนต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตัวอย่างกุ้งกุลาดำบางส่วนเก็บรักษาสภาพในน้ำยาของ RF (RNA friendly fixative; Hasson *et al.*, 1997) ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อถาวรโดยวิธีการเดียวกับข้างต้น แต่ทำการตรึงเนื้อเยื่อบนสไลด์ที่ทับด้วย Poly-L-Lysine (Sigma, St. Louis, MO) แล้วตรวจสอบอวัยวะเป้าหมายของเชื้อ TSV โดยวิธีการของบริษัท Diagxotics (Shrimp probe Diagxotics test kit, *in situ* hybridization, Diagxotics, USA) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสังเขปคือละลายพาราฟาสต์ด้วยไซลีน และนำน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดยลดระดับความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์ จากนั้นจึงแช่สไลด์ตัวอย่างในสารละลาย PBS นาน 5 นาที ซับตัวอย่างให้แห้ง แล้วหยดสารละลาย proteinase-K เข้มข้น 20 มก./มล ให้ท่วมเนื้อเยื่อบนสไลด์ ใส่กล่องปิดฝาและนำไปบ่มที่ 60°C นาน 15 นาที ล้างสไลด์ด้วยสารละลาย PBS ที่มี glycine ผสมอยู่ 0.2% แล้วนำไปทำปฏิกิริยา hybridization โดยหยดสารละลาย TSV probe ให้ท่วมเนื้อเยื่อและวางบน heat block ที่ 95°C นาน 6 นาที โดยไม่ให้สารละลายแห้ง และนำไปใส่ในกล่องที่มีความชื้น ปิดฝาและบ่มในที่มืดที่ 42°C นาน 12 ชม. นำมาล้างสารละลายส่วนเกิน และหยดสารละลาย blocking buffer ให้ท่วม 10 นาที จึงหยดสาร

ละลาย anti-Dig/AP conjugate ให้ท่วมนาน 10 นาที ล้างสไลด์ด้วย TBS buffer แล้วหยดสารละลาย development ให้ท่วมวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จึงหยดสารละลาย stop buffer ให้ท่วมนาน 10 นาที แล้วย้อมสไลด์ด้วยสารละลาย bismark brown-Y 0.5% จากนั้นจึงล้างสีส่วนเกินและดึ่งน้ำออกจากเซลล์โดยเพิ่มระดับของเอทิลแอลกอฮอล์แช่ในไซลีน หยดสารละลายเปอร์เม้าท์ ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเนื้อเยื่อและเซลล์ที่ติดเชื้อ TSV จะติดสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ ส่วนบริเวณเซลล์ปกติจะพบการติดสีน้ำตาลอ่อนของ bismark brown-Y

ผลการทดลอง

การกระจายของเชื้อ TSV และการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้งบ่อเลี้ยง

จากการเก็บข้อมูลการกระจายของเชื้อ TSV ในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 ถึงพฤษภาคม 2548 โดยวิธีการเก็บอย่างกุ้งบ่อเลี้ยงที่มีการรายงานถึงความผิดปกติในบริเวณพื้นที่ อ.ระโนด จ.สงขลา อ.ละงู และ อ.ทุ่งหว้า จ.สตูล และอ.เมือง จ.ปัตตานี ผลจากเก็บกุ้งขาว จำนวน 38 บ่อ พบกุ้งติดเชื้อ TSV จำนวน 13 บ่อ คิดเป็น 34.21% ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจำนวน 6 บ่อคิดเป็น 15.79% โดยกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV ส่วนมากมีสีตัวส้มจาง บางตัวพบแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำบริเวณเปลือกและเนื้อเยื่อใต้เปลือก (Figure 1) ส่วนการระบาดของโรคนี้นในกุ้งกุลาดำที่เก็บตัวอย่างและตรวจสอบในช่วงเวลาเดียวกันจำนวน 18 บ่อ พบกุ้งติดเชื้อจำนวน 6 บ่อ คิดเป็น 33.33% และติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จำนวน 9 บ่อ คิดเป็น 50% โดยกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ TSV มีแผลสีดำบริเวณเปลือก แขนง และเนื้อเยื่อใต้เปลือก กุ้งส่วนใหญ่มีเปลือกนูน และสีซีดกว่ากุ้งปกติ (Figure 1) การเพาะเชื้อ *Vibrio* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบกุ้งขาวติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว 20 บ่อ จากทั้งหมด 38 บ่อ คิดเป็น 52.63% ส่วนกุ้งกุลาดำติดเชื้อแบคทีเรีย 11 บ่อจากทั้งหมด 18 บ่อ คิดเป็น 61.11% โดยทั้งกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวในบ่อที่ตรวจพบการติดเชื้อ TSV หรือไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วยทุกบ่อ (Table 1)



Figure 1. White shrimp infected TSV showed pale pinkish bodies and black spot on integument and epithelial tissue (arrow) (A) and Black tiger shrimp infected TSV showed pale color, soft shell and black spot on integument and epithelial tissue (arrow) (B).

(Color figure can be viewed in the electronic version)

Table 1. The distribution of Taura virus and *Vibrio* spp. infection in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*P. vannamei*) in earthen pond cultured in Songkhla, Satun and Pattani province during October 2004 - March 2005.

Sampling areas	<i>P. monodon</i>			<i>P. vannamei</i>		
	Sampling no.	TSV Infected	<i>Vibrio</i> sp. infected	Sampling no.	TSV Infected	<i>Vibrio</i> sp. infected
Songkhla	13	5	8	19	6	10
Satun	3	1	3	13	5	8
Patthani	2	0	0	6	2	2
Total	18	6	11	38	13	20
% infection	-	33.33	61.11	-	34.21	52.63

Table 2. Accumulate mortality of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) (3-5 g) post infection with Taura virus isolated from moribund *Penaeus monodon* and *P. vannamei* and reared in 2 different conditions for 15 days period.

Culture condition	Accumulate mortality (%)	
	TSV isolated from <i>P. monodon</i>	TSV isolated from <i>P. vannamei</i>
With aeration (DO 5.79 mg/L)*	16.67	30
Without aeration (DO 3.25 mg/L)*	50	70

* DO = Dissolved Oxygen

การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ TSV ใน กุ้งกุลาดำ

จากการฉีดเชื้อ TSV โดยใช้สารละลายเชื้อที่เจือจาง ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-5} จากแหล่งเชื้อที่แยกจากกุ้งกุลาดำและ กุ้งขาว ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเริ่มต้น

12.12 และ 12.36 มก./มล ตามลำดับ ให้กุ้งกุลาดำขนาด 3-5 กรัม และเลี้ยงนาน 15 วัน พบว่า เชื้อ TSV จาก กุ้งขาวป่วยและเจือจาง 10 เท่า ทำให้กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงใน สภาพแวดล้อมที่เดิมออกซิเจนตลอดเวลา (ปริมาณออกซิเจน ที่ละลายน้ำเฉลี่ย 5.79 มก./ลิตร) ตายสูงสุด 30% ส่วน



Figure 2. Black tiger shrimp infection with TSV by IP injection for 3 days period showed black spot on shell (arrow) with pale reddish body.

(Color figure can be viewed in the electronic version)

แหล่งเชื้อที่แยกจากกุ้งกุลาดำที่ระดับการเจือจางเท่ากัน ทำให้กุ้งทดลองตายสูงสุด 16.67% (Table 2) โดยกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อไม่รับอาหารในช่วง 1-2 วันแรก ตัวที่ตายหรือใกล้ตายมีแผลดำตามเปลือกและผิวใต้เปลือก ตัวมีสีออกแดงและมีเปลือกนูนกว่ากุ้งปกติในชุดควบคุม (Figure 2) ตัวที่รอดตายเมื่อเลี้ยงต่อไปพบว่ามีการลอกคราบ และทำให้เปลือกที่มีลักษณะจุดดำลดลงเรื่อยๆ เมื่อทำการฉีดเชื้อไวรัส TSV จากแหล่งเชื้อทั้ง 2 แหล่งซึ่งเจือจาง 10 เท่า ให้กุ้งกุลาดำขนาดเดียวกัน และเลี้ยงกุ้งในน้ำที่ไม่เติมอากาศในถังเป็นระยะเวลา 15 วัน (ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำเฉลี่ย 3.25 มก./ลิตร) พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อทั้ง 2 แหล่งมีอัตราการตายสูงกว่าชุดการทดลองที่เลี้ยงในสภาวะให้อากาศมากเกินไป โดยกุ้งทดลองที่ได้รับเชื้อที่แยกจากจากกุ้งกุลาดำป่วยมีอัตราการตาย 50% ส่วนกุ้งชุดที่ได้รับเชื้อ TSV ที่แยกจากกุ้งขาวเป็นโรคมะเร็งอัตราการตาย 70% (Table 2) เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสในตัวอย่างกุ้งที่ตายด้วยวิธี RT-PCR พบกุ้งทุกตัวติดเชื้อ TSV จากการเพาะเชื้อแบคทีเรียจากตับและตับอ่อนของกุ้งที่ตายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบว่ากุ้งกุลาดำส่วนใหญ่ติดเชื้อกลุ่ม *Vibrio* spp. ร่วมด้วย

การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเซลล์ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ TSV

จากการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส TSV โดยการย้อมสีฮีมาท็อกซียลีนและอีโอซิน พบเซลล์ที่ติดเชื้อมีลักษณะเป็นอินคลูชันบอดีตึ๊ดสีอีโอซินและบางส่วนตึ๊ดสีฮีมาท็อกซียลีน (eosinophilic and

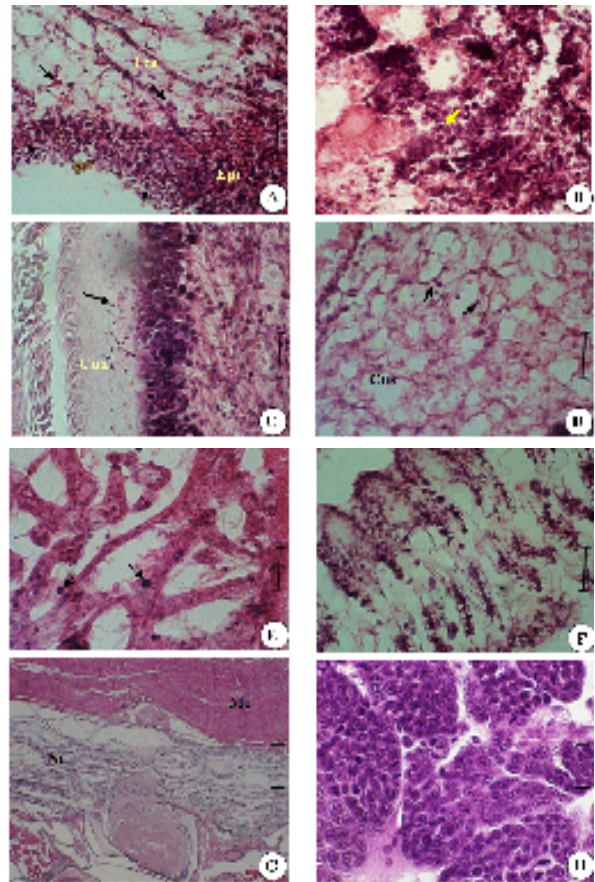


Figure 3. Black tiger shrimp infected with TSV indicated by necrosis and degeneration of cell and tissues (arrow) in various organs; (A) subcuticular epithelial tissue (Epi) and tegmental gland (Teg); (B) haemopoietic tissue; (C) epithelial tissue of stomach; (D) spongy connective tissue (Cns); (E) antennal gland (Ang); (F) gill and negative tissue showed in (G) nerve tissue (Nt) and Muscle (Mc); (H) haemopoietic tissue (bar = 50 μ m for A, B, C, D, E, F, G and H; H&E stained)

(Color figure can be viewed in the electronic version)

basophilic inclusion bodies) ขนาดไม่สม่ำเสมอกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อใต้เปลือก (subcuticular epithelial tissue) เนื้อเยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร (stomach epithelial tissue) เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissue) พบเซลล์จำนวนมากติดเชื้อและ

กลายเป็นอินคลูชันบอดี นอกจากนั้นยังพบเซลล์ที่ติดเชื้อ กระจายอยู่ในต่อมใต้เปลือก เนื้อเยื่อต่อมโคนหวด เหงือก และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Figure 3)

ส่วนพยาธิสภาพและอวัยวะเป้าหมายของเชื้อ TSV ในเนื้อเยื่อที่ทำการตรวจโดยวิธี *in situ* hybridization พบว่า เซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสมีลักษณะติดสีดำกระจายทั่วไป ทั้งในเนื้อเยื่อเหงือก ต่อมน้ำเหลือง เนื้อเยื่อใต้เปลือก เซลล์ในต่อมใต้เปลือก ต่อมโคนหวด ภาวะอาหาร และเซลล์ที่แทรกตัวในกล้ามเนื้อ (Figure 4)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการกระจายของเชื้อ TSV ในกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวในสภาพแวดล้อมของบ่อเลี้ยงบริเวณ 3 จังหวัด คือ สงขลา ปัตตานี และสตูล พบว่าเชื้อไวรัส TSV ที่น่าจะ แอบแฝงมากับกุ้งขาวซึ่งนำเข้ามาเป็นพ่อแม่พันธุ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 ได้แพร่กระจายไปในพื้นที่เลี้ยงกุ้งทะเลของทั้ง 3 จังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่างศึกษา และพบเชื้อดังกล่าวได้ กระจายไปในฟาร์มกุ้งกุลาดำบริเวณใกล้เคียงในปริมาณที่ไม่ แตกต่างกับการระบาดของโรคนั้นในกุ้งขาว เนื่องจากพบการ แพร่กระจายของเชื้อไวรัสในบ่อที่ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวคิดเป็น 33.33 และ 34.21% ตามลำดับ แสดง ให้เห็นว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถที่จะแพร่ไปสู่เจ้าบ้านชนิด ใหม่คือกุ้งกุลาดำได้ โดยกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ TSV มีหลาย ขนาดตั้งแต่ขนาดที่ปล่อยลงบ่อเพียงเดือนเศษ (ประมาณ 3-4 กรัม/ตัว) จนถึงขนาดตลาด (12-15 กรัม/ตัว) จากการ ตรวจสอบและบันทึกสภาพน้ำในบ่อเลี้ยงพบว่าหากสภาพ แวดล้อมภายในบ่อไม่เหมาะสม เช่น บ่อที่มีสาหร่ายขนแมว (*Oscillatoria* spp.) เจริญมาก ๆ หรือมีซีแดดบริเวณมุมบ่อ ปริมาณของออกซิเจนละลายน้ำใกล้พื้นบ่อต่ำ 3.2-3.4 มก./ ลิตร อัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ TSV ในบ่อจะค่อนข้างสูง โดยอาจมีการตายหมดทั้งบ่อแต่เป็นไปในลักษณะการทยอย ตาย ซึ่งแตกต่างจากการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว หรือไวรัสหัวเหลือง ที่พบว่ากุ้งกุลาดำที่ติดเชื้ออาจตายหมด บ่อเพียง 5-7 วัน หลังการติดเชื้อ (จิราพร และคณะ, 2538, Limsuwan, 1991)

อย่างไรก็ตาม ในบ่อที่มีสภาพแวดล้อมที่น้ำมีสีเขียว อ่อน ออกซิเจนละลายน้ำอยู่ในช่วง 5.4-6.5 มก./ลิตร จะ

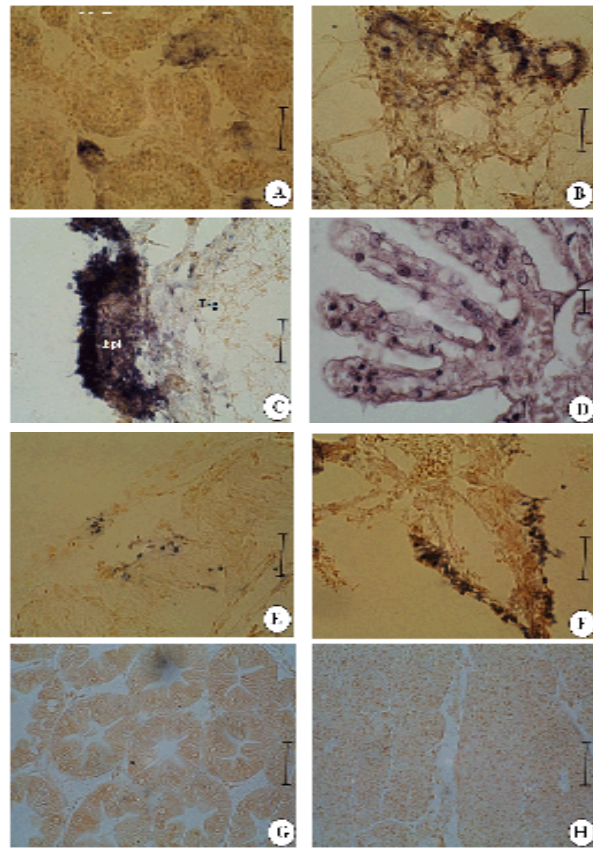


Figure 4. TSV infected cell indicated by black precipitate were distributed in various tissue; (A) lymphoid organ; (B) antennal gland (Ang); (C) subcuticular epithelial tissue (Epi) and tegmental gland (Teg); (D) gill; (E) muscle; (F) epithelial tissue of stomach and negative reaction showed in (G) hepatopancrease and (H) lymphoid organ (bar = 50 μ m for A, B, C, E, F, G and H; bar = 200 μ m for D; by *in situ* hybridization, Diagxotics, USA)

(Color figure can be viewed in the electronic version)

พบอัตราการตายของกุ้งในบ่อน้อย โดยพบกุ้งตายในยอคครั้งละ 3-5 ตัว และหากผู้เลี้ยงทำการเก็บตัวอย่างกุ้งที่ตาย หรือใกล้ ตายออกทั้งหมด พบว่าสามารถเลี้ยงกุ้งต่อจนจับจำหน่ายได้ จากการสอบถามผู้เลี้ยงพบว่ากุ้งที่เหลือในบ่อหลังลอกคราบ แล้วผลดำนเปลือกจะลดลง สอดคล้องกับการทดลองติด เชื้อ TSV โดยการฉีดในกุ้งกุลาดำและเลี้ยงในระบบของห้อง

ปฏิบัติการพบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อไวรัสที่แยกจากกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาวป่วยมีการติดเชื้อและตาย 16.67% และ 30% หากเลี้ยงในระบบน้ำที่มีออกซิเจนสูงๆ (5.79 มก./ลิตร) สอดคล้องกับ Brock (1997) ที่กล่าวว่าความรุนแรงของโรค TSV ในกุ้งกุลาดำซึ่งทำการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการมีค่อนข้างต่ำ และพบกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสจะไม่แสดงอาการของโรค อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองครั้งนี้พบว่ากุ้งกุลาดำมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นเป็น 50% และ 70% ในสภาพแวดล้อมของการทดลองที่น้ำมีออกซิเจนละลายอยู่เพียง 3.25 มก./ลิตร นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อ TSV ทุกบ่อมีการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ร่วมด้วย เมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างกุ้งที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงพบว่ากุ้งกุลาดำและกุ้งขาวติดเชื้อแบคทีเรีย 61.11 และ 52.63% ตามลำดับ นั่นแสดงให้เห็นว่ากุ้งทะเลที่เลี้ยงในบ่อดินกว่า 50% ติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้แล้ว จึงมีความเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อแบคทีเรียก่อนจะเป็นปัจจัยโน้มนำให้กุ้งที่ได้รับเชื้อ TSV เกิดโรคและตายสูงขึ้น หรืออาจจะเป็นไปได้ว่าเมื่อกุ้งได้รับเชื้อไวรัส TSV แล้ว หากมีการติดเชื้อเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วยก็จะทำให้กุ้งที่ติดเชื้อร่วมแสดงอาการของโรคและตายเร็วและมากขึ้น อีกนัยหนึ่งคือทำให้กุ้งเกิดโรคได้รุนแรงขึ้นนั่นเอง เช่นเดียวกับผลการติดเชื้อร่วมระหว่างเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลือง มีผลให้กุ้งกุลาดำมีอัตราการตายสูงและเร็วขึ้น (จีพร, 2546)

จากข้อมูลดังกล่าวจึงชี้ให้เห็นว่าความรุนแรงของโรค TSV จะมีโอกาสเกิดขึ้นและมีความรุนแรงสูงในสภาพแวดล้อมของบ่อเลี้ยงมากกว่าในระบบทดลอง ซึ่งสภาพในของบ่อเลี้ยงนั้นพบว่าปัจจัยหลายอย่างมีผลให้กุ้งเกิดความเครียดและโน้มนำให้เกิดโรคและมีความรุนแรงมากขึ้น Supamattaya และคณะ (2000) กล่าวว่า สภาพแวดล้อมการเลี้ยงที่มีออกซิเจนละลายน้ำต่ำ 0.9-1.2 มก./ลิตร หรือมีอุณหภูมิต่ำ (25°C) กวาระดับปกติ (29-30°C) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งกุลาดำ การทำงานของเอ็นไซม์ ฟีนอลออกซิเดส และเปอร์เซ็นต์การจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดลดลง ซึ่งผลดังกล่าวจะทำให้กุ้งมีโอกาสติดเชื้อต่างๆ ที่อยู่ในน้ำได้มากขึ้น ในขณะที่ Kautsky และคณะ (2000) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ เช่น ออกซิเจนละลายน้ำ ความเค็ม และอุณหภูมิ ในรอบวันสูงๆ จะเป็นปัจจัยที่มีผลเพิ่มความเครียด และทำให้กุ้งกุลาดำ

ยอมรับเชื้อและเกิดโรคต่างๆ ได้ง่ายขึ้น เช่นเดียวกับ Chotikachinda และคณะ (2005) กล่าวว่าความหนาแน่นคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยง เช่น การให้อากาศเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ อุณหภูมิ น้ำ ความเค็ม การลำเลียงขนส่งลูกกุ้ง จะเป็นปัจจัยที่สำคัญส่งผลให้กุ้งกุลาดำเกิดความเครียดในการเลี้ยง ดังนั้นการควบคุมสภาวะต่างๆ ในระหว่างการเลี้ยง การลำเลียงลูกกุ้งระยะที่มีความแข็งแรง คือตั้งแต่ระยะ PL-12 ขึ้นไป การควบคุมปัจจัยแวดล้อมของการเลี้ยงภายในบ่อให้เหมาะสม การควบคุมปริมาณเชื้อ *Vibrio* spp. ในน้ำไม่ให้มีปริมาณสูงเกินไป จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ประกอบการจะต้องคำนึงถึง เพราะปัจจัยดังกล่าวจะช่วยลดระดับความรุนแรงของโรค TSV ในกุ้งกุลาดำลงได้ระดับหนึ่ง

การศึกษาพยาธิสภาพของโรค TSV ในกุ้งกุลาดำโดยวิธีย้อมสีฮีมาท็อกซาลินและอีโอซิน พบว่าไวรัสเมื่อเข้าสู่ตัวกุ้งแล้วจะเข้าสู่เซลล์เป้าหมายในอวัยวะต่างๆ เกือบทุกส่วน โดยเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อผิวหนังต่างๆ ทั้งเนื้อเยื่อได้เปลือก เนื้อเยื่อผิวหนังระเพาะอาหาร และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด ที่สามารถตรวจพบกลุ่มเซลล์ตายและอินคลูชันบอดี้ของเซลล์ที่ติดเชื้อในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการติดตามอวัยวะเป้าหมายของเชื้อโดยวิธี *in situ* hybridization พบเซลล์ติดเชื้อหนาแน่นในบริเวณเนื้อเยื่อข้างต้น นอกจากนี้วิธีการตรวจสอบนี้ยังชี้ให้เห็นว่าเชื้อไวรัส TSV ยังเข้าทำลายเซลล์ที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่ออื่นๆ คือ กล้ามเนื้อ เหงือก ต่อมเหงือก ต่อมโคนหนวด เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รวมทั้งเซลล์ในต่อมได้เปลือก ถึงแม้ว่าจะพบเซลล์ที่ติดเชื้อน้อยกว่าเนื้อเยื่อผิวหนังก็ตาม จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าปัจจุบันนี้ กุ้งกุลาดำกลายเป็นเจ้าบ้านที่ยอมรับเชื้อ TSV ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะในฟาร์มที่มีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมจะเป็นปัจจัยเสริมให้กุ้งที่ติดเชื้อแสดงอาการภายนอกของโรคชัดเจน และมีอัตราการตายสูง และสามารถตรวจสอบอวัยวะเป้าหมายของในเซลล์ของเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วน ยกเว้นเซลล์ในเนื้อเยื่อตับและตับและตับอ่อน หัวใจ ลำไส้ส่วนซีกัม รวมทั้งประสาทและปมประสาทที่ไม่พบเซลล์ที่ติดเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบผลการติดเชื้อ TSV จากแหล่งเชื้อที่แยกจากกุ้งกุลาดำในเจ้าบ้านชนิดเดิมคือกุ้งขาวและติดตามการกระจายของเชื้อในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยวิธีการเดียวกันพบว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถทำเข้าเซลล์เป้าหมายต่างๆ ในอวัยวะเกือบทุกส่วน

ของกุ้งขาวเช่นกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้ง 2 แหล่งในการทดลองนี้เป็นเชื้อที่มีแหล่งที่มาจากกุ้งขาวที่นำเข้ามาเลี้ยง หลังจากเชื้อสามารถปรับให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ได้ก็ทำให้เกิดโรคที่รุนแรงในเจ้าบ้านใหม่คือ กุ้งกุลาดำ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Flegel (2003) ที่ว่ากุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกรามที่อาศัยในบ่อกุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV ไม่แสดงอาการของโรคหรือเกิดการตายแม้ว่าจะพบเชื้อไวรัสดังกล่าวอยู่ในตัวสัตว์จากการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR แต่การแพร่กระจายเชื้อ TSV ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทยที่พบในการศึกษานี้ สอดคล้องกับกรณีการระบาดของโรคเดียวกันในกุ้ง *P. stylirostris* ในเม็กซิโก และสหรัฐอเมริกา ที่พบว่าช่วงแรกกุ้งชนิดนี้มีความต้านทานต่อโรค TSV จึงเลือกมาเลี้ยงทดแทนกุ้งขาวที่มีอัตราการตายสูง แต่เมื่อเลี้ยงไประยะหนึ่งกุ้ง *P. stylirostris* ก็มีอัตราการตายสูงด้วย (Johnson, 1995; Zarain and Ascencio, 2001) Robles-Sikisaka และคณะ (2002) ได้ตั้งข้อสังเกตไว้ก่อนหน้าการระบาดของโรคนี้ในเม็กซิโกว่าการนำกุ้งชนิดอื่นที่ต้านทานต่อโรคเข้ามาทดแทนกุ้งชนิดเดิมที่มีปัญหาการติดเชื้อและมีอัตราการตายสูงนั้น อาจนำมาซึ่งการปรับตัวของเชื้อในเจ้าบ้านชนิดใหม่ และกลายเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่รุนแรงขึ้นก็เป็นได้ ซึ่งเพียง 2 ปีหลังการนำกุ้ง *P. stylirostris* มาเลี้ยงทดแทนกุ้งขาวพบว่าเชื้อ TSV ทำให้กุ้งชนิดดังกล่าวมีอัตราการตายสูงถึง 90% (OIE, 2003) เช่นเดียวกับกรณีการระบาดของโรคเดียวกันในกุ้งทะเลที่เลี้ยงในไต้หวัน (Chamberlain, 1994)

นอกจากนั้นจากข้อมูลข้างต้นน่าจะบ่งชี้ว่าเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรค TSV ในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำในประเทศไทยน่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือมีความใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์ฮาวาย และได้หวัน เนื่องจากผลการใช้ชุดทดสอบที่มีความจำเพาะกับเชื้อ TSV (DiagXotics, USA) ติดตามเชื้อในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวให้ผลเป็นบวกอย่างชัดเจน ซึ่ง Robles-Sikisaka (2002) ได้ตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อ TSV 4 สายพันธุ์ ที่แยกจากกุ้งป่วยแหล่งต่างๆ คือ จากมลรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ไต้หวัน เม็กซิโก และนิการากัว พบว่า เชื้อไวรัสทั้ง 4 แหล่งข้างต้นนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สายพันธุ์จากฮาวายและไต้หวันที่ให้ผลเป็นบวกจากการทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบเดียวกันกับการศึกษานี้ ส่วนสายพันธุ์เม็กซิโกและนิการากัวให้ผลเป็นลบ ทั้งนี้การที่จะสรุปว่าเชื้อทั้ง 2 แหล่งคือที่แยก

จากกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวเป็นโรค ในประเทศไทยมีลักษณะเหมือนกันหรือมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นหรือไม่อย่างไรนั้น จำเป็นเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในระดับโมเลกุลทั้งชนิดและขนาดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ และการเปรียบเทียบลำดับเบสในโครงสร้างของไวรัสต่อไป

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าไวรัส TSV ซึ่งเคยก่อโรคในกุ้งขาวมีการแพร่กระจายลงสู่ระบบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย โดยเชื้อไวรัสสามารถทำให้กุ้งกุลาดำเกิดโรคและตาย โดยในระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการจัดการบ่อและฟาร์มไม่เหมาะสม เช่น บ่อมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำ มีชี้แดด รวมทั้งสภาวะการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ในกุ้งจะเป็นปัจจัยโน้มนำให้กุ้งเกิดความเครียดและเพิ่มโอกาสให้กุ้งเกิดโรคที่รุนแรง และมีผลให้กุ้งในบ่อมีอัตราการตายสูงได้ ดังนั้นการคัดเลือกลูกกุ้งที่ปลอดจากเชื้อก่อโรคทุกชนิด การควบคุมสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงให้เหมาะสม การตรวจสอบสุขภาพกุ้งที่เลี้ยงอย่างสม่ำเสมอ และการจัดการบ่อที่ถูกสุขลักษณะ น่าจะเป็นการลดโอกาสการเกิดโรค หรือลดความรุนแรงของโรคได้ และหากกุ้งมีการติดเชื้อ TSV แล้ว การควบคุมไม่ให้เชื้อแพร่กระจายออกไปในพื้นที่อื่นๆ โดยการป้องกันไม่ให้มีการลำเลียงกุ้งที่ติดเชื้อข้ามเขตน่าจะเป็นแนวทางที่ลดหรือตัดวงจรการแพร่กระจายของเชื้อ TSV ไปสู่พื้นที่ปลอดโรคอื่นๆ ได้ รวมทั้งการฆ่าเชื้อ TSV ในกุ้งและในน้ำก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ก็เป็นแนวทางในการควบคุมไม่ให้เชื้อแพร่กระจายลงสู่สภาพแวดล้อม และก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำสายพันธุ์พื้นเมืองชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนได้อีกทางหนึ่งด้วย

เอกสารอ้างอิง

- จิราพร เกษรจันทร์ สิทธิ บุญรัตผลิน เรวัตกร คงประดิษฐ์ และ อุษณีย์ เอกปนิธานพงษ์. 2538. ไวรัสรูปร่างสาเหตุของโรคติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/ 2538. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง สงขลา.
- จรีพร เรืองศรี. 2546. การตอบสนองแบบกึ่งจำเพาะของภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 129 หน้า

- จีพร เรื่องศรี ไมตรี วรรณเดช สุณีย์ หวันเหลี่ยม อนิดา สงนุ้ย
สุพัตรา อรุณรัตน์ นพรัตน์ แทนมาก จีราพร เพชรรัตน์
และกิจการ สุขมาตย์. 2546. การเกิดโรคและความ
รุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* จากคอนไคของไทย
ในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 26: 43-54.
- Bell, T.A. and Lightner, D.V. 1988. A Handbook of
Normal Penaeid Shrimp Histology. World
Aquacult. Soc., Baton Rouge, LA. 114 p.
- Bondad, R.M.G., McGladdery, S.E., East, I. and
Subasinghe, R.P. (eds.) 2001. Asia Diagnostic
Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fish-
eries Technical Paper No. 402, Supplement 2.
Rome. 240 p.
- Brock, J.A. 1997. Special Topic Review: Taura
syndrome, a disease important to shrimp farms
in the Americas. World J. Microbiol. Biotechnol.
13: 415-418.
- Brock, J.A., Lightner, D.V., Hasson, K. and Gose, R.
1996. An Update on Taura Syndrome of Farmed
Shrimp in the Americas. World Aquaculture 96,
Book of Abstracts, World Aquacult. Soc., Baton
Rouge, LA. 50 p.
- Chamberlain, G.W. 1994. Taura syndrome and China
collapse caused by new shrimp viruses. J. World
Aquacult. 25: 22-25.
- Chotikachinda, R., Phongdara, A., Ruangsri, J. and
Supamattaya, K. 2005. MBV infection in various
stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).
Songklanakarin J. Sci. Technol. 27(Suppl.): 199-
214.
- Currie, D. 1998. Columbian shrimp farmers prepare for
the 21st century. J. World Aquacult. 29: 18-21.
- Flegel, T.W. 2003. Shrimp Viral Disease I. **In** Inter-
national Training Course Biology and Patho-
biology of Black Tiger Shrimp. SCBT 608
Current Topic in Biotechnology, Faculty of
Science, Mahidol University.
- Hasson, K.W., Hasson, J., Aubert, H., Redman, R.M.
and Lightner, D.V. 1997. A new RNA-friendly
fixative for the preservation of penaeid shrimp
samples for virological detection using cDNA
genomic probes. J. Virol. Method. 66: 227-236.
- Humason, G. 1979. Animal Tissue Techniques. Free-
man, W.H. and Company, San Francisco. 661 p.
- Johnson, S.K. 1995. Taura virus hits Texas. J. World
Aquacult. 26: 82-83.
- Kautsky, N., Ronnback, P. and Tedengren, M. 2000.
Ecosystem perspectives on management of
disease in shrimp pond farming. Aquaculture
191: 145-161.
- Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology
and Diagnostic Procedures for Diseases of
Cultured Penaeid Shrimp. World Aquacult. Soc.,
Baton Rouge, LA, USA.
- Lightner, D.V., Jones, L.S. and Ware, G.W. 1994.
Proceedings of the Taura Syndrome Workshop
Executive Summary. University of Arizona,
Tucson, USA.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Poules, B.T., Nunan,
L.M., Mari, J.L., Masson, K.W. and Bonami,
J.R. 1997. Taura Syndrome: etiology, pathology,
hosts and geographic distribution, and detection
methods. **In**: New Approaches to Viral Diseases
of Aquatic Animals. Nat. Res. Inst. Aquacult.
Japan 190-225.
- Limsuwan, C. 1991. Handbook for cultivation of black
tiger prawns. Tansetakit Co. Ltd, Bangkok.
- Nunan, L.M., Poulos, B.T. and Lightner, D.V. 1998.
Reverse transcription polymerase chain reaction
(RT-PCR) used for the detection of Taura
syndrome virus (TSV) in experimentally infected
shrimp. Dis. Aquat. Org. 34: 87-91.
- OIE. 2003. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic
Animals; Chapter 4.1.1 Taura syndrome virus.
12 pp. (<http://www.oie.int>)
- Robles-Sikisaka, R., Hasson, K.W., Garcia, D.K.,
Brovont, K.E., Cleveland, K.D., Klimpel, K.R.
and Dhar, A.K. 2002. Genetic variation and
immunohistochemical differences among geo-
graphic isolated of taura syndrome virus of
penaeid shrimp. J. Gen. Virol. 83: 3123-3130.
- Sambrook, J. Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning,
A Laboratory Manual. 3rded. Cold Spring Harbor
Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sukrakanchana, N., Kiriratnikom, S., Ruangsri, J. and
Supamattaya, K. 2005. Import risk analysis: A
case study of white shrimp in Thailand. Songkla-
nakarin J. Sci. Technol. 27(Suppl.): 225-238.

- Supamattaya, K., Ruangsri, J., Kiriratnikom, S. and Suanyuk, N. 2000. The immune system in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius: V. Effect of water temperature, DO and pH on immuno-physiological functions in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. Songklanakarin J. Sci. Technol. 22(Suppl.): 605-613.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Kongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirono, I. and Aoki, T. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) in *Penaeus monodon* Fabricius. J. Fish Dis. 19:399-403.
- Vallejo, I.A. and Newmark, F. 1999. Epizootiological study of *Penaeus vannamei* in three farms of the Colombian Caribbean. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras Santa Marta 28:19-42.
- Yu, C.I. and Song, Y.L. 1999. Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. Fish Pathol. 35: 21-24.
- Zarain, H.M. and Ascencio, V.F. 2001. Taura syndrome in Mexico: follow up study in shrimp farms of Sinaloa. Aquaculture 193: 1-9.