สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ ชลบุรี 20131

การตรวจหาเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในจังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิค RT nested-PCR

DETECTION OF LAEM SING VIRUS IN GIANT TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) AT CHANTHABURI PROVINCE USING REVERSE TRANSCRIPTION NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

พัชราภรณ์ น้อยผล

PATCHARAPORN NOIPHON

12 มิ.ย. 2551
1635

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีทางทะเล
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การตรวจหาเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)ในจังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิค RT Nested-PCR DETECTION OF LAEM SING VIRUS IN GIANT TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) AT CHANTHABURI PROVINCE USING REVERSE TRANSCRIPTION NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION
โดย	นางสาวพัชราภรณ์ น้อยผล
คณะ	เทคโนโลยีทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ มลฤดี สนธิ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วิจิตรา โหราเรือง

คณะเทคโนโลยีทางทะเลได้พิจารณาปัญหาพิเศษฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางทะเลของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....รักษาการแทนคณบดีคณะเทคโนโลยีทางทะเล

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรุณี เทอดเทพพิทักษ์)

คณะกรรมการตรวจสอบปัญหาพิเศษ

.....ประธาน

(อาจารย์มลฤดี สนธิ)

.....กรรมการ

(อาจารย์วิจิตรา โหราเรือง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

47330404: สาขาวิชา: เทคโนโลยีทางทะเล; วท.บ. (เทคโนโลยีทางทะเล)
คำสำคัญ: ไวรัสแหลมสิงห์/ กุ้งกุลาดำ/ RT nested-PCR

พัชราภรณ์ น้อยผล: การตรวจหาเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในจังหวัดจันทบุรีด้วยเทคนิค RT nested-PCR (DETECTION OF LAEM SING VIRUS IN GIANT TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) AT CHANTHABURI PROVINCE USING REVERSE TRANSCRIPTION NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION): อาจารย์ที่ปรึกษา: มลฤดี สนธิ, วท.ม., อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: วิจิตรา โหราเรือง, วท.ม., 36 หน้า. พ.ศ. 2550.

การตรวจหาเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงในจังหวัดจันทบุรี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงกุ้งในอำเภอท่าใหม่ 33 บ่อ อำเภอแหลมสิงห์ 2 บ่อ จากนั้นนำมาตรวจเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ด้วยเทคนิค RT nested-PCR ผลการศึกษาพบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำในจังหวัดจันทบุรีคิดเป็น 37.14 เปอร์เซ็นต์ (13/35) ซึ่งพบเชื้อในเขตอำเภอท่าใหม่ทั้งหมด โดยบ่อที่พบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) ร่วมอยู่ด้วย การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไวรัสแหลมสิงห์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

47330404: MAJOR: MARINE TECHNOLOGY; B.Sc. (MARINE TECHNOLOGY)
KEYWORDS: LAEM SING VIRUS, GIANT TIGER SHRIMP, REVERSE TRANSCRIPTION NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

PATCHARAPORN NOIPHON: DETECTION OF LAEM SING VIRUS IN GIANT TIGER SHRIMP (*Penaeus monodon*) AT CHANTHABURI PROVINCE USING REVERSE TRANSCRIPTION NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION. SPECIAL PROBLEM ADVISOR: MOLRUEDEE SONTHI, M.Sc., SPECIAL PROBLEM CO-ADVISOR: WIJITRA HORARUANG, M.Sc. 36 PAGES. 2007.

Detection of Laem Sing virus, LSNV of giant tiger shrimp in Chanthaburi province was studied using RT nested-PCR. Shrimps were collected from 33 cultured ponds at Thamai district and 2 cultured ponds at Laem Sing district. The results showed that presence of Laem Sing virus have only positive about 37.14% (13/35) at Thamai dist rict. Surprisingly, the infected shrimps with Laem Sing virus could also be detected WSSV. From the present work obtained information on the dispersion of Laem Sing virus in Chanthaburi province. This information may be importance in monitoring and protect in shrimp population from disease outbreak.
shrimps. Hence, the monitoring WSSV outbreak in this area is very importance.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

ขอบพระคุณ อาจารย์ มลฤดี สนธิ อาจารย์ที่ปรึกษาที่คอยคำปรึกษา และความช่วยเหลือทุก ๆ ด้านตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ถึงแม้จะมีอุปสรรคและปัญหาบ้าง แต่อาจารย์ก็คอยให้คำแนะนำที่ดีเสอมมา ตลอดจนสละเวลาในการตรวจทาน และแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ วิจิตรา โหราเรือง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมซึ่งคอยให้ความรู้ คำแนะนำ ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจกุล ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.พิชัย สนแจ้ง อาจารย์วศิน ยุวนะเตมีย์ และคณาจารย์คณะเทคโนโลยีทางทะเลทุกท่านที่ได้สั่งสอนวิชาความรู้ต่าง ๆ ตลอดจนสิ่งดี ๆ ในการใช้ชีวิตการเป็นนิสิตภายในมหาวิทยาลัยที่เป็นสี่ปีที่ไม่สามารถหาได้จากที่ไหนได้อีก

ขอขอบพระคุณพี่ ๆ ที่ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีและพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกคนที่คอยช่วยเรื่องอุปกรณ์ สถานที่ และคำแนะนำดี ๆ และให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำในจังหวัดจันทบุรีทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และให้ข้อเสนอแนะที่ดีในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

ขอบคุณ เพื่อน ๆ คณะเทคโนโลยีทางทะเลรุ่น 4 ทุกคน ที่อยู่ร่วมทุกข์ร่วมสุขเสอมมาตลอดทั้งสี่ปี ทั้งคอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือในทุกเรื่อง รวมทั้งท่านอื่น ๆ ที่มิได้เอ่ยนามในที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ ยาย และน้องชายทั้งสองคน ที่ให้ความสนับสนุนในทุก ๆ เรื่องทั้งด้านการเรียน การเงิน คอยเป็นที่ปรึกษาและเป็นแรงใจที่สำคัญตลอดมาในชีวิต ขอบคุณมาก ๆ ค่ะ

เพื่อน ฝ้าย จะคิดถึงและจะอยู่ในใจตลอดไป

พัชราภรณ์ น้อยผล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

สถานที่ทดลองและระยะเวลาเก็บข้อมูล..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ..... 4

กลุ่มโรคที่พบในกุ้งทะเล..... 8

เทคนิค RT nested-PCR..... 14

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 18

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 20

อุปกรณ์..... 20

สารเคมี..... 21

วิธีการทดลอง..... 21

4 ผลการวิจัย..... 27

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ..... 27

5 อภิปรายและสรุปผล..... 31

อภิปรายผลการวิจัย..... 31

สรุปผลการวิจัย..... 33

ข้อเสนอแนะ..... 33

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม	34
ประวัติย่อของผู้วิจัย	36

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	การเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำในจังหวัดจันทบุรี	22
4-1	การตรวจเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ	27

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ลักษณะของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)..... 4

2-2 พัฒนาการของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน..... 6

2-3 ขั้นตอนของเทคนิค RT-PCR..... 15

2-4 ขั้นตอนของเทคนิค nested PCR..... 17

4-1 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis..... 30

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ทางด้านทรัพยากรธรรมชาติเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในด้านของทรัพยากรทางการเกษตร ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งในการผลิตอาหารของประชากรในประเทศ และยังสามารถจำหน่ายเป็นสินค้าส่งออกทั่วโลก โดยเฉพาะการส่งออกของกุ้งกุลาดำที่เป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศได้มากกว่าแสนล้านบาท มากเป็นอันดับ 5 ของสินค้าส่งออก และประเทศไทยนั้นเป็นทั้งผู้ผลิตและส่งออกกุ้งกุลาดำได้มากเป็นอันดับหนึ่งของโลก เนื่องจากเป็นอาหารที่สามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้มากและเป็นที่นิยมในการบริโภค (สำนักรักษาเสถียรภาพสินค้าเกษตร กรมการค้าภายใน, 2544) โดยการผลิตในปี พ.ศ. 2543-2544 ประมาณ 3,000 เมตริกตันต่อปี เป็นผลผลิตที่ได้จากพื้นที่การเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลประมาณ 300,000 ไร่ และผลผลิตที่ได้จากพื้นที่การเลี้ยงความเค็มต่ำประมาณ 300,000 ไร่

แต่ในปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำยังประสบปัญหาในด้านอัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาการติดเชื้อจากโรคต่าง ๆในกุ้งกุลาดำที่นับวันยิ่งทวีความรุนแรงและเป็นปัญหาในระดับต้น ๆ ของการเพาะเลี้ยง กลุ่มของเชื้อโรคที่พบได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และพยาธิ จากปัญหาดังกล่าวทำให้เกษตรกรใช้ยาต้านจุลชีพในการป้องกันและรักษาโรคในอัตราสูง อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวได้ผลไม่ดีเท่าที่ควรและยังก่อให้เกิดผลเสียตามมามากมาย เช่น การทำลายแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ อีกทั้งการใช้ยาที่ผิดวิธียังทำให้แบคทีเรียก่อโรคมีการพัฒนาตัวเองกลายเป็นสายพันธุ์ที่ด้านทานยา ทำให้การใช้ยาไม่ได้ผล รวมทั้งการขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้ยา และสารเคมีที่ถูกต้องของเกษตรกรผู้เลี้ยงส่งผลทำให้มีการตกค้างของสารเหล่านั้นในเนื้อกุ้ง ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และเกิดผลเสียอย่างมากในด้านการส่งออกโดยผู้นำเข้ากุ้งจากประเทศไทยมักใช้เป็นข้ออ้างในการกีดกันทางการค้าอยู่เสมอ ด้วยเหตุนี้เราจึงต้องหันมาหาวิธีการต่างๆ เพื่อป้องกันการเกิดโรค เช่น การหาสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค การหาพื้นที่การระบาด การตรวจหาเชื้อชนิดใหม่ที่อาจก่อให้เกิดความผิดปกติในกุ้งได้ เพื่อให้สามารถแก้ไขปัญหาได้อย่างถูกวิธี รวมทั้งสามารถควบคุมพื้นที่การระบาดไม่ให้เชื้อเข้าไปในระบบเลี้ยงได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมาการเลี้ยงกุ้งเกือบทุกพื้นที่ จะพบว่ากุ้งมีการเจริญเติบโตช้าและมีขนาดที่แตกต่างกันมากในขณะที่จับกุ้งขาย โดยเฉพาะในปี พ.ศ. 2545 เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำทั่วประเทศประสบปัญหากุ้งโตช้ามาก (Monodon slow growth syndrome, MSGS) ทำให้ส่วนใหญ่ขาดทุนเนื่องจากผลผลิตไม่ได้ตามเป้าหมาย เพราะกุ้งมีขนาดเล็ก 3-5 กรัม เป็นจำนวนมากในขณะที่จับขาย (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2547) ปรากฏการณ์ที่กุ้งโตช้านี้ได้เกิดการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว และเกิดได้ในหลายพื้นที่ หลายสภาวะ ทำให้เกิดสมมุติฐานถึงสาเหตุการโตช้านี้หลายประการ เช่น อาจมาจากภาวะการติดเชื้อโดยพาหะบางชนิด หรืออาจจะมีสาเหตุมาจาก โปรโตซัว และไวรัสบางชนิด ได้แก่ Monodon baculovirus (MBV), Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV) และ Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virous (IHHNV) ทำให้เกษตรกรบางส่วนเปลี่ยนไปเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแทน เพราะเป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่ากุ้งกุลาดำ และในปี พ.ศ. 2549 กัลยา ศรีธัญญลักษณ์ และคณะ ได้รายงานเกี่ยวกับการพบไวรัสชนิดใหม่ในประเทศไทย โดยเชื้อไวรัสชนิดนี้จะทำให้กุ้งกุลาดำมีการเจริญเติบโตช้าและมีอาการแคระแกร็น และได้ตั้งชื่อไวรัสชนิดนี้ว่า ไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ซึ่งตั้งชื่อตามสถานที่ที่พบไวรัสครั้งแรกในกุ้ง เนื่องจากเป็นไวรัสชนิดใหม่ที่เพิ่งค้นพบ ทำให้มีข้อมูลเกี่ยวกับระบาดวิทยาน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะตรวจหาเชื้อ LSNV ในกุ้งกุลาดำ ที่เลี้ยงในบ่อเลี้ยงในจังหวัดจันทบุรี โดยใช้เทคนิค RT nested-PCR ซึ่งจะทำให้ทราบถึงข้อมูลด้านการระบาดของไวรัสชนิดนี้ จากการศึกษาจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานการระบาดของเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร และหน่วยงานควบคุมโรค เพื่อเป็นหนทางที่จะควบคุมการนำเข้าสายพันธุ์กุ้งปลอดโรคและการควบคุมโรคต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงในบ่อกุ้ง จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิค RT nested-PCR (reverse transcription nested polymerase chain reaction)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสแหลมสิงห์
2. เพื่อให้เกษตรกรมีการเฝ้าระวัง ป้องกันและแก้ไขปัญหาได้อย่างถูกวิธี หรือมีการจัดการบ่อเลี้ยงที่ถูกต้อง
3. นำข้อมูลที่ได้นี้ไปพัฒนาและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไวรัสแหลมสิงห์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. เพื่อให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำประสบผลสำเร็จในการเลี้ยง ทำให้มีรายได้เพิ่มขึ้นในระยะยาว และยั่งยืน

5. เพื่อควบคุมการนำเข้าสายพันธุ์กุ้งที่ปลอดโรค

ขอบเขตของการวิจัย

สุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากบ่อเลี้ยงกุ้ง ในเขตจังหวัดจันทบุรี เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ด้วยเทคนิค RT nested-PCR

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) และบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำของเกษตรกร ในจังหวัดจันทบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ (Tinker, 1965)

ภาพที่ 2-1 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Deacapoda

Suborder Dendrobranchiae

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชื่อไทย : กุ้งกุลาดำ กุ้งกุลา กุ้งกะลา กุ้งเสื้อดำ กุ้งเสือ กุ้งลาย

ชื่อภาษาอังกฤษ : Giant tiger shrimp

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Penaeus monodon*

ลักษณะทั่วไป

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในเอเชีย มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในเขตอินโดแปซิฟิก (Dall, 1957) มีเปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน ฟันกรีด้านบน 7-8 ซี่ ช่องด้านกรีทั้ง 2 ด้านแคบและยาว กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีสีสดใส ผิวเป็นมันมองเห็นชัดเจนเนื่องจากมีการสะสมของเม็ดสี (Chromatophore) ที่เปลือกคลุม (Cuticle) สีของลำตัวอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามขนาดและสภาพแวดล้อม เช่น สีน้ำตาลเข้ม สีแดงคล้ำ หรือสีม่วงอมเทา และอาจเปลี่ยนแปลงตามระยะการลอกคราบ (Molting) ได้อีกด้วย โดยเมื่อลอกคราบใหม่ ๆ สีจะซีดไม่สดใส เป็นต้น บริเวณปล้องท้องจะมีแถบสีเทาหรือดำพาดขวางสลับกับสีขาว ขาว่ายน้ำมีสีเทาปนน้ำเงินส่วนโคนขามีแต้มสีขาวส่วนปลายมีขนสีแดงแต้มอยู่โดยรอบ ขาเดินเป็นสีแดงดำมีสีขาวอยู่ประปราย แพนหางและหางเป็นสีเดียวกับลำตัว โดยทั่วไปกุ้งที่พบมีความยาวลำตัวทั้งหมด 80-377 มิลลิเมตร

กุ้งกุลาดำมีลักษณะคือมีหนวด 2 คู่ ระยางค์ของร่างกายแยกเป็น 2 แฉก ลำตัวยาวแบ่งเป็นข้อปล้อง 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (Head) ส่วนอก (Thorax) ที่มักจะรวมติดกันเรียกว่าส่วนหัวอก (Cephalothorax) และส่วนลำตัว (Abdomen) ระยางค์ส่วนต่าง ๆ จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ การหายใจและการกินอาหาร (Platon, 2002)

ส่วนหัวมี 5 ปล้องแต่รวมกันเป็นปล้องเดียว ระยางค์ส่วนหัว (Cephalic appendages) มี 5 คู่ 2 คู่แรกเป็นหนวดเรียกว่า Attennule และ Attenna ตามลำดับ มีหน้าที่รับสัมผัสทั้งคู่ โดยหนวดคู่แรกสั้นกว่าเปลือกคลุมหัว ระยางค์คู่ที่ 3 (Mandible) เป็นขากรรไกรล่าง ส่วนระยางค์คู่ที่ 4 (Maxilulae) เป็นขากรรไกรบน ระยางค์ทั้ง 3 คู่นี้ทำหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหารทั้งหมด ปากของกุ้งจะอยู่ระหว่างขากรรไกร

ส่วนอกมี 8 ปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 6-13 มีระยางค์ส่วนอก (Thoracic appendages) รวม 8 คู่ ระยางค์ 3 คู่แรกเรียกว่า Maxilipeds มีหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร ระยางค์ 5 คู่ถัดมาเป็นขาเดิน โดย 3 คู่แรกมีลักษณะเป็นก้าม (Chelate) หรือคล้ายก้าม (Sub chelate) ก้ามแต่ละอันมีขนาดและความยาวเท่ากัน อันเป็นลักษณะเฉพาะของกุ้งทะเลในวงศ์ *Penaeidae* มีหน้าที่จับอาหารเข้าปาก หรือป้องกันตัว ส่วนขาเดิน 2 คู่สุดท้ายมีลักษณะเป็นปลายแหลม

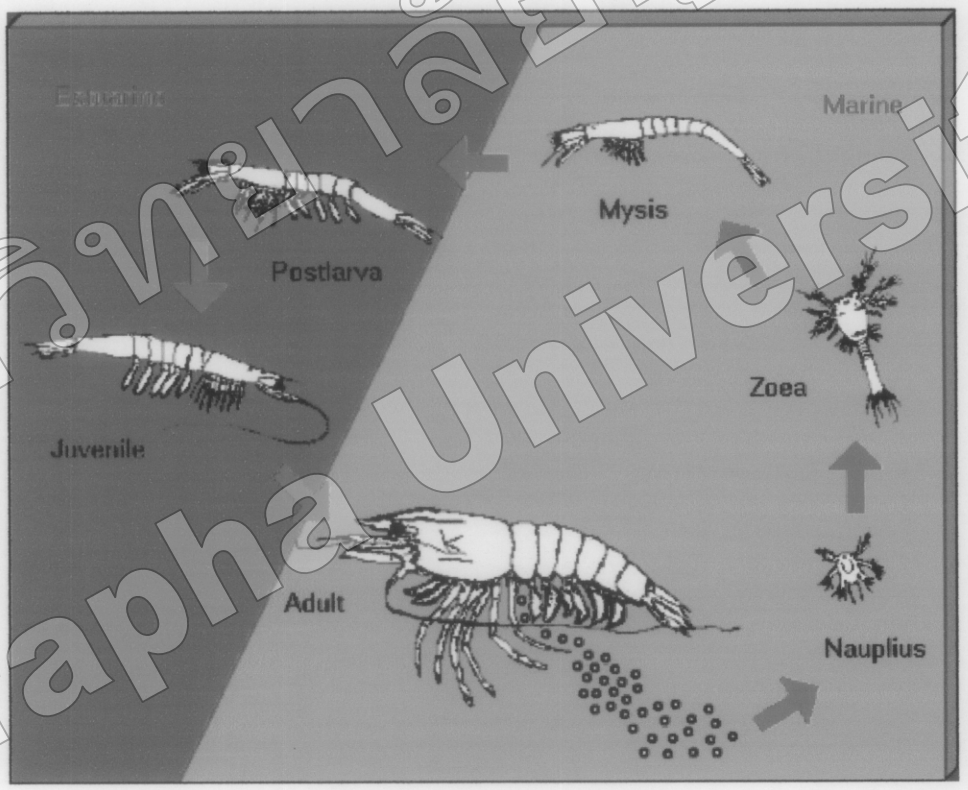
ส่วนท้องมี 6 ปล้อง มีระยางค์ท้อง (Abdominal appendages) 6 คู่ ระยางค์ 5 คู่แรก (Pleopods) มีลักษณะคล้ายใบพาย ใช้สำหรับว่ายน้ำ ระยางค์คู่สุดท้ายเปลี่ยนสภาพเป็นแผ่นบาง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ทำหน้าที่เป็นแพนหาง (Urpod) หรือใบพาย ซึ่งมีส่วนโค้งสั้นต่อออกไป และขยายเป็นแผ่นใหญ่ 2 แฉก อยู่ทั้ง 2 ข้างของปลายหาง (Telson) ช่วยในการเคลื่อนที่ (Tinker, 1965)

วงจรชีวิต

กุ้งกุลาดำที่มีขนาดตั้งแต่ 90-200 กรัม เป็นขนาดที่เหมาะสมในการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ เมื่อแม่กุ้งปล่อยไข่แล้วจะมีการแบ่งเซลล์จนกระทั่งฟักออกเป็นตัวอ่อน ว่ายน้ำได้อิสระใช้เวลาประมาณ 14-15 ชั่วโมง ซึ่งการพัฒนาของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนแบ่งได้เป็น 4 ระยะดัง**ภาพที่ 2-2** คือ



ภาพที่ 2-2 พัฒนาการของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน (ประจวบ หลำอุบล, 2530)

ระยะแรก เรียกวัยอ่อนระยะนี้ว่า นอเพลียส (Nauplius) มีรูปร่างแบบกระสวยลำตัวยาว มีขนแข็งที่ปลายสุด 2 เส้น มีจุดตรงกลางส่วนหน้าทำหน้าที่คล้ายตา ระยะนี้แบ่งออกเป็นระยะย่อย 6 ระยะ ผ่านการลอกคราบถึง 5 ครั้ง คือ Nauplius 1-6 ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน ในระยะนี้มักจะไม่กินอาหาร

ระยะที่ 2 เป็นระยะ ซูเอีย (Zoea) ตัวอ่อนระยะนี้มีการพัฒนามากขึ้น มีระยางค์ 7 คู่ เริ่มมองเห็นร่องรอบของเปลือกคลุมหัว ส่วนท้ายของลำตัวแยกเป็น 2 แฉก แต่ยังไม่แบ่งเป็นข้อปล้อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เริ่มมักมีกรีเกิดขึ้นพร้อมกับก้านตาจะยาวขึ้น ระยะนี้แบ่งออกเป็นระยะย่อย 3 ระยะ คือ Zoea ระยะที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ แต่ละระยะมีการลอกคาบ 1 ครั้ง ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 3-4 วัน ในระยะนี้ลูกกุ้งจะกินอาหารพวกพืชและสัตว์น้ำขนาดเล็ก

ระยะที่ 3 เป็นระยะ ไมซิส (Mysis) ตัวอ่อนระยะนี้มีลักษณะที่สำคัญคือ มีระยางค์ส่วนอก 5 คู่ คู่สุดท้ายจะแยกออกเป็น 2 แฉก ทำหน้าที่สำหรับเคลื่อนที่ ระยะนี้แบ่งออกเป็นระยะย่อย 3 ระยะ มีการลอกคราบ 3 ครั้งภายในเวลา 4-5 วัน ลูกกุ้งระยะนี้จะกินอาหารทั้งพืชและสัตว์ขนาดเล็ก เช่น ไดอะตอม ไรน้ำเค็ม เป็นต้น

ระยะที่ 4 เป็นตัวอ่อนขั้นสุดท้าย เรียกว่าระยะ โพสต์ลาวา (Post larva) ระยะนี้มีขาว่ายน้ำเจริญขึ้นทำหน้าที่สำหรับว่ายน้ำ ลูกกุ้งระยะนี้จะสามารถกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์

ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะต่อ ๆ ไปถึงลูกกุ้งวัยรุ่นจะมีการพัฒนาเฉพาะในเรื่องของขนาดและสัดส่วนรูปร่างจะเหมือนเดิม (ประจวบ หลำอุบล, 2537)

การลอกคราบ

กุ้งจำเป็นต้องลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต ทั้งนี้เพราะเปลือกกุ้งเป็นอวัยวะที่ไม่สามารถเพิ่มขนาดได้เหมือนกับเปลือกหอยหรือกระดองเต่า ดังนั้นในการเพิ่มขนาดตัวของกุ้งแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องสลัดเอาเปลือกเก่าทิ้งไปแล้วสร้างเปลือกใหม่ที่มีขนาดใหญ่กว่าขึ้นมาแทน กุ้งจะเริ่มลอกคราบตั้งแต่ฟักออกจากไข่เพียงไม่กี่ชั่วโมง และจะลอกคราบไปเรื่อย ๆ ตลอดชีวิต ก่อนที่กุ้งจะลอกคราบจะมีการสะสมอาหารในร่างกายมากกว่าปกติโดยเฉพาะสารที่สร้างเปลือก เพราะเปลือกจะต้องแข็งตัวโดยเร็ว หลังจากลอกคราบแล้ว เมื่อกุ้งสลัดเปลือกออกหมด ลำตัวจะขยายใหญ่ขึ้น และเปลือกจะแข็งตัวภายใน 3 –8 ชั่วโมง การลอกคราบของกุ้งแต่ละครั้งอยู่ภายใต้การควบคุมของระบบประสาทส่วนกลางและฮอร์โมนสองชนิดที่อยู่ในก้านตา ดังนั้นถ้ามีการตัดก้านตาออกจะทำให้กุ้งลอกคราบได้เร็วขึ้น แต่โดยทั่วไปกุ้งจะลอกคราบช้าหรือเร็วนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ หลายอย่างด้วย เช่น วัยของกุ้ง อาหาร แสงและอุณหภูมิ ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับกุ้งจะลอกคราบห่างกันครั้งละประมาณ 20–30 วัน

การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่นิยมเลี้ยงกันมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย โดยธรรมชาตินั้นกุ้งตัวเมียจะวางไข่ในทะเลที่มีน้ำลึกตั้งแต่ 10 เมตรขึ้นไป ไข่ของกุ้งจัดอยู่ในประเภทไข่จม (Dermersal egg) ใช้เวลาตั้งแต่ฟักออกเป็นตัวจนกระทั่งโตเป็นวัยรุ่นประมาณ 2

สัปดาห์ ลูกกุ้งจะใช้ชีวิตในสภาพของแพลงก์ตอนจนกระทั่งเข้ามาอยู่ใกล้ชายฝั่งจะกลายเป็นกุ้งวัยอ่อนขั้นสุดท้าย กุ้งในระยะนี้จะมีการปรับตัวเข้ามาอาศัยอยู่ในปากแม่น้ำและป่าชายเลน เมื่อโตเต็มวัยก็จะเดินทางกลับออกสู่ทะเลเพื่อสืบพันธุ์และวางไข่ต่อไป (ประจวบ หลำอุบล, 2530)

Motoh (1981) รายงานว่าจะพบกุ้งกุลาดำกระจายตัวอยู่ในแนวละติจูดที่ 35 องศาเหนือถึง 35 องศาใต้ ซึ่งพบว่าจะครอบคลุมถึงพื้นที่ประเทศเขตร้อนเป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ ประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทยนอกจากนี้ยังพบกุ้งกุลาดำกระจายในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน สิงคโปร์ ศรีลังกา อินเดีย ปากีสถาน ฮ่องกง ออสเตรเลีย และแทนซาเนีย

บุญรัตน์ ประทุมชาติ (2545) กล่าวว่า กุ้งกุลาดำมีการแพร่กระจายในเขตอินโดเวส-แปซิฟิก ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย ศรีลังกา อินเดีย นิวกินี ออสเตรเลียและบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน และอ่าวไทย นอกจากนี้ ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ (2531) พบว่ากุ้งกุลาดำชอบอาศัยในที่ที่พื้นดินเป็นทรายปนโคลน หรือทรายปนเปลือกหอย และหินปะการัง และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในน้ำกร่อยหรือบ่อเลี้ยงได้

กลุ่มโรคที่พบในกุ้งทะเล

ปัญหาเรื่องโรคและการจัดการสุขภาพกุ้งในฟาร์มเลี้ยงจะเกี่ยวพันกับปัญหาพื้นฐานอยู่ 3 ปัญหาใหญ่ ๆ คือ ปัญหาการจัดการบ่อ ปัญหาการติดเชื้อโรคต่าง ๆ และปัญหาการใช้ยาหรือเคมีภัณฑ์ในการจัดการ ซึ่งจะส่งผลต่อต้นทุนการผลิต การป้องกันหรือการแก้ปัญหาโรคที่เกิดขึ้นนั้นไม่ง่ายนักเนื่องจากสาเหตุของการเกิดโรคไม่ใช่เกิดจากสาเหตุเดียว แต่จะมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกับปัจจัยจากการจัดการอื่น ๆ เช่นคุณภาพน้ำหรือสภาพดินก้นบ่อรวมถึงสุขภาพตัวกุ้งเองด้วย ดังนั้นการรักษาโรคจึงไม่เป็นเพียงแค่ใช้ยาหรือสารเคมีในการกำจัดเชื้อโรคเพียงอย่างเดียว แต่จะรวมไปถึงการจัดการสภาพต่าง ๆ ภายในบ่อเลี้ยงให้ดีขึ้นควบคู่ไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามสาเหตุของโรคแต่ละโรคและปัจจัยโน้มนำต่าง ๆ จะแตกต่างกันไป ดังนั้นเกษตรกรจำเป็นจะต้องทำความเข้าใจกับสาเหตุพื้นฐานของโรคในแต่ละชนิดหรือกลุ่มเพื่อที่จะได้แก้ปัญหาได้อย่างตรงจุดและทันเวลา สำหรับสาเหตุของโรคที่สำคัญต่าง ๆ สามารถจะแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้

1. โรคติดเชื้อที่ทำให้ผลผลิตกุ้งเสียหายอย่างรุนแรง สามารถแยกได้ดังนี้คือ โรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส และโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โรคกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสที่สำคัญคือ โรคไวรัสตัวแดงดวงขาวและโรคหัวเหลือง โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้แก่ โรคแบคทีเรียเรืองแสง และโรคตายเดือน เป็นต้น

2. โรคที่ทำความเสียหายไม่รุนแรง ได้แก่โรคที่เกิดจากโปรโตซัวต่าง ๆ และไวรัสบางชนิด เช่น Monodon baculovirus (MBV), Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV) และ Monodon

baculovirus, Hepatopancreatic Parvo Virus (IHHNV) โรคที่สร้างความเสียหายและพบมากได้แก่ โรคที่มีสาเหตุจากซูโอแทมเนี่ยม (Zoothamnium) เกี่ยวข้อง เช่น ปัญหาเหงือกสกปรก ตัวสกปรก (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2547) นอกจากนี้ยังพบปัญหาการเลี้ยงกุ้งไม่ได้ขนาดตามที่ต้องการ กุ้งมีการเจริญเติบโตช้า มีอาการแคระแกร็น และกุ้งในบ่อเดียวกันมีขนาดแตกต่างกันมาก

กลุ่มโรคที่ทำให้กุ้งทะเลเจริญเติบโตได้น้อยลง (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545)

1. โรคแคระแกร็น (Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virous, IHHNV)

การติดเชื้อ IHHNV จะก่อให้เกิดโรค Runt Deformity Syndrome (RDS) เป็นโรคสำคัญชนิดหนึ่งในกุ้งขาว *(Penaeus vannamei* และ *Penaeus stylirostris)* แต่มีลักษณะความไวต่อโรคต่างกันออกไป กุ้งขาว *P. stylirostris* เมื่อติดเชื้อ IHHNV จะมีอัตราการตายสูงมาก ในขณะที่ *P. vannamei* ความเสียหายขึ้นอยู่กับการจัดการฟาร์มเมื่อกุ้งป่วย ถ้ามีการจัดการที่ดีก็จะมีความเสียหายน้อย

สาเหตุของโรค

ไวรัส IHHNV มีขนาด 22 นาโนเมตร เป็น DNA virus ที่มีสาย DNA สายเดียว จัดเป็นพวก พาโวไวรัส (parvovirus) ในกุ้งขาว *P. vannamei* ที่ติดเชื้อ IHHNV จะก่อให้เกิดกลุ่มอาการ RDS ที่มีอาการป่วยที่กระทบต่อผลผลิตของฟาร์ม โดยโรคนี้จะทำให้การเจริญเติบโตหยุดชะงัก อัตราการเจริญเติบโตลดลง แต่ในกุ้งแข็งแรงจะมีขนาดสม่ำเสมอ ในขณะที่กุ้งติดเชื้อที่อ่อนแอจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด สำหรับในกุ้งขาว กุ้งชนิดนี้จะแสดงอาการอย่างเรื้อรัง หรือที่เรียกว่า Runt-deformity syndrome (RDS) โดยกุ้งในระยะวัยรุ่น (2-3 เดือน) จะพบว่ามีอาการกรีดงอ หนวดงอ เปลือกไม่เรียบและเสียรูปร่าง และไม่โต โดยจะพบกุ้งลักษณะเช่นนี้ 30-50 เปอร์เซ็นต์ การตรวจวินิจฉัยโดยทั่วไปยังใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยาตรวจดูอวัยวะ เช่น เหงือก เปลือกกุ้ง ระบบประสาท ไต อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เป็นต้น ในต่างประเทศนิยมใช้วิธี DNA dot blotting ในการตรวจและในปัจจุบันสามารถใช้วิธี PCR ในการตรวจสอบโรคได้แล้ว

การแพร่กระจาย

การแพร่กระจายเชื้อไวรัสชนิดนี้พบว่า นอกจากการกระจายตามปกติในบ่อกุ้ง ทั้งการกินกันเองและการติดเชื้อในน้ำแล้ว อีกทางหนึ่งก็คือผ่านทางมูลนก ซึ่งการกระจายเชื้อระหว่างฟาร์มหนึ่งไปอีกฟาร์มหนึ่งเป็นไปในลักษณะเดียวกันทั้งเชื้อ IHHNV และเชื้อทอร่า (Taura Syndrome virus, TSV) โรคนี้มีถิ่นกำเนิดในเขตมหาสมุทรแปซิฟิค และมหาสมุทรอินเดีย (Indo-

Pacific origin) แต่ปัจจุบันพบแพร่กระจายไปทั่วโลก โดยสร้างความเสียหายให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของเม็กซิโกอย่างมหาศาล ประเทศที่พบการระบาดของ IHHNV แล้วคือ ไต้หวัน สิงคโปร์ มาเลเซีย ไทย อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย ฟิลิปปินส์ เอกวาดอร์ เปรู อเมริกากลาง อเมริกา บราซิล อิสราเอล

ลักษณะอาการ

โรคนี้ทำให้อัตราแลกเนื้อของกุ้งเสียไป แม้จะใช้อาหารที่ดีก็ตาม กุ้งที่ติดเชื้อ IHHNV จะมีอัตราแลกเนื้อสูง ทำให้ผู้เลี้ยงขาดทุน น้ำหนักลด อาการที่สำคัญคือ การกินอาหารลดลง กุ้งกินกันเอง ทยอยตาย ลอยหัว หมุนควงสว่าน อัตราการตาย 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในกุ้งที่ติดโรคจะพบจุดขาวหรือเหลืองหม่น ที่เปลือก โดยเฉพาะบริเวณรอยต่อของแผ่นปิดช่องท้อง

2. **โรคเอ็มบีวี (Monodon baculovirus, MBV)**

ตรวจพบครั้งแรกที่ไต้หวันในปี 2524 และระบาดในหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทย การตายเนื่องจากเชื้อไวรัสตัวนี้ยังไม่มีความรุนแรงมากนัก และไม่ชัดเจน โดยจะมีสาเหตุแทรกซ้อนอื่นๆ ที่ทำให้กุ้งตายจากเชื้อตัวนี้อีกมาก

สาเหตุของโรค

เกิดจากเชื้อแบคคิวโลไวรัส มีขนาดความยาว 280-300 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 70-75 นาโนเมตร การวินิจฉัยจะนำตับกุ้ง หรือส่วนของระยางค์กุ้งมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบเม็ด inclusion bodies ซึ่งเป็นก้อนโปรตีนของเชื้อไวรัส

ลักษณะอาการ

จะไม่แสดงอาการชัดเจนว่าติดเชื้อ ไม่มีอาการเด่นชัด จะเกิดร่วมกับการติดเชื้ออื่นๆ จะพบลูกกุ้งสีเข้มกว่าปกติกินอาหารน้อยแคระแกร็น

3. **โรคไวรัสเอชพีวี (Hepatopancreatic Parvo Virus, HPV)**

โรคไวรัสเอชพีวีได้พบมานานแล้วในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทย แต่ความสูญเสียของกุ้งกุลาดำที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้ยังไม่มีการศึกษาและสรุปกันอย่างชัดเจน เนื่องจากไวรัสชนิดนี้มีความรุนแรงต่ำเหมือนกับไวรัสเอ็มบีวี อีกทั้งยังพบได้ในกุ้งปกติ สภาวะที่ทำให้กุ้งเครียด สภาพการเลี้ยงไม่ดีก็จะทำให้กุ้งป่วยและมีโรคแทรกซ้อนอย่างอื่นได้ง่ายขึ้น ปัจจุบันยอมรับว่าเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้กุ้งในบ่อมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าปกติ

สาเหตุของโรค

เกิดมาจากเชื้อไวรัส ssDNA ในกลุ่มพาโวไวรัส ซึ่งเป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กมาก เส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อไวรัสประมาณ 22-24 นาโนเมตร การติดเชื้อจะพบเฉพาะบริเวณตับและ

ตับอ่อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนอย่างชัดเจนซึ่งสามารถวินิจฉัยได้ง่ายโดยนำส่วนของตับและตับอ่อนมาย้อมด้วยมาลาไคท์กรีน (Malachite Green) 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือฮีมาทอกซิลิน (Haematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) แล้วนำมาส่องกล้องจุลทรรศน์ โดยที่เราจะต้องให้ตับและตับอ่อนคงสภาพเป็นพูเป็นท่ออยู่ก็จะเห็น inclusion bodies ในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนโดยมีตำแหน่งอยู่ปลายของท่อตับ ซึ่ง inclusion bodies ของไวรัสเอชพีวีนี้จะมีขนาดใหญ่เกือบเต็มนิวเคลียสและเบียดนิวเคลียโครมาติน (Nuclearchromatin) ของกุ้งไปอยู่ทางด้านข้าง

ลักษณะอาการ

อาการของโรคเอชพีวีในกุ้งกุลาดำจะสังเกตได้ยาก ไม่มีอาการเด่นชัด ส่วนใหญ่จะมีอาการร่วมกับการติดเชื้อชนิดอื่น ๆ

กลุ่มโรคที่ทำให้กุ้งทะเลตาย (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2547)

1. **โรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV)**

โรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำพบการระบาดในประเทศจีนและญี่ปุ่นตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2536 ในประเทศไทยพบการระบาดตอนปลาย พ.ศ. 2537 บริเวณที่รุนแรงคือ ภาคตะวันออกแถบ จ.จันทบุรี จ.ตราด และภาคใต้ฝั่งตะวันออก จ.นครศรีธรรมราช จ.ปัตตานี ฝั่งตะวันตก จ.ตรัง การระบาดก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่อธุรกิจเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศ

สาเหตุของโรค

เกิดจากเชื้อไวรัส (Systemic Ectidermal & Mesodermal Baculovirus, SEMBV) รูปร่างเชื้อเป็นแท่งความยาว 270-300 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 110-125 นาโนเมตร เชื้อไวรัสสามารถทำลาย เนื้อเยื่อผิวใต้เปลือก เหงือก อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เม็ดเลือด ต่อมน้ำเหลือง นิวเคลียสของเซลล์จะบวมโต การวินิจฉัยจะส่งกุ้งไปตรวจหาเชื้อโดยทำวิธี PCR

ลักษณะอาการ

ผิวใต้เปลือกกุ้งตลอดทั้งตัวมีสีแดงเรื่อๆ ชมพูถึงเข้ม บางครั้งจะพบออกเป็นสีส้ม และพบจุดขาวขนาด 0.1-2 มิลลิเมตร ใต้เปลือกบริเวณส่วนหัวและตัว กุ้งที่เป็นโรคจะว่ายอยู่ผิวน้ำ เกยขอบบ่อ อ่อนแอ กินอาหารลดลง ลอกคราบไม่ออก ตัวนิ่ม อัตราการตาย 80-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 4-5 วัน หลังจากตรวจพบเชื้อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. โรคไวรัสทอร่า (Taura Syndrome virus, TSV)

สาเหตุของโรค

สาเหตุของโรคทอร่า ซินโดรม นั้นทราบกันโดยทั่วไปว่าเกิดจากเชื้อไวรัส ชื่อ ไวรัสทอร่า (Taura Virus), ไวรัสทอร่า ซินโดรม (Taura Syndrome Virus) ซึ่งโรคนี้วินิจฉัยพบครั้งแรกเมื่อเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งจำนวนหนึ่งใกล้กับแม่น้ำทอร่า (Taura River) ในเอกวาดอร์ โรคนี้ทำให้กุ้งพันธุ์พื้นเมืองของทวีปอเมริกาเหนือและใต้ที่ชื่อ กุ้งขาวแปซิฟิค หรือ Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*) ติดเชื้อ ป่วยและตายได้

ไวรัสทอร่ามีขนาด 31-34 นาโนเมตร เป็น RNA virus ที่มีสาย RNA สายเดียว จัดเป็นพวก พิโคนาไวรัส (Picornavirus) ซึ่งจะเข้าไปอาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึม ของเซลล์บุผนังของกุ้งที่ติดเชื้อ

ลักษณะอาการ

อาการของโรคทอร่า ซินโดรม มี 2 ระยะ คือ ระยะเฉียบพลัน (Peracute) และระยะเรื้อรัง (Chronic or recovery) ระยะเฉียบพลัน มักจะเกิดในกุ้งวัยอ่อน ในระยะ 2 สัปดาห์ที่นำลงบ่ออนุบาล โรคนี้จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก ทำให้เปลือกอ่อนนิ่ม กุ้งมักจะตายช่วงลอกคราบ ลักษณะอีกอย่างที่แสดงว่ากุ้งติดเชื้อคือ ปื้นสีแดงซีดที่เกิดจากการอักเสบของเซลล์สีแดงในชั้นผิวหนังและที่แพนหาง กุ้งซึ่งรอดตายและสามารถลอกคราบได้จะมีอาการดีขึ้นหรืออาจเข้าสู่การติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งมักแสดงรอยโรคหลาย ๆ แห่งที่เปลือก

โดยทั่วไปทอร่าซินโดรมติดกุ้งขาว *P. vannamei* วัยอ่อน ช่วงน้ำหนัก 0.1-0.5 กรัม หรือช่วง 2-4 สัปดาห์หลังปล่อยลงบ่อดิน ไวรัสทอร่าเป็นโรคที่แสดงอาการผิดปกติของเปลือกกุ้ง (Cuticle epidermis) ในกรณีที่ติดเชื้อไม่เฉียบพลัน (Chronic) ไวรัสทอร่า ก่อให้เกิดจุดดำกระจายทั่วไปตามเปลือก

ระหว่างการระบาด จะพบกุ้งตายหรือป่วยใกล้ตายในแหที่ใช้ทอดสุ่มน้ำหนักกุ้ง หรือก้นบ่อ หรือท่อน้ำทิ้ง ส่วนกุ้งที่ติดเชื้อระยะเฉียบพลันจะอ่อนแอ ว่ายน้ำสะเปะสะปะ เปลือกอ่อนนิ่ม และทำให้เซลล์เม็ดสี (Chromatophore) กระจายไปทั่ว ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสีของกุ้งเพียงเล็กน้อย กุ้งที่เป็นโรคนี้มักจะไม่มีอาหารในลำไส้ พบอัตราการตายของกุ้งอยู่ระหว่าง 5-95 เปอร์เซ็นต์

3. โรคหัวเหลือง (Yellow Head Virus, YHV)

สาเหตุของโรค

เกิดจากเชื้อไวรัสวายเอชวี (Yellow-head baculovirus, YHV) ซึ่งมีความยาว 150-200 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 45-50 นาโนเมตร สามารถติดเชื้อได้ทั้งบริเวณเหงือก ต่อมน้ำเหลือง

อวัยวะสร้างเม็ดเลือดและเม็ดเลือด การวินิจฉัยทำโดย การตรวจย้อมเม็ดเลือด ประกอบกับการดูอาการ และอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น

ลักษณะอาการ

ลำตัวกุ้งมีสีซีด มองเห็นส่วนหัวมีสีเหลือง เนื่องจากตับและตับอ่อน (Hepatopancreas) มีสีซีดเหลือง กุ้งที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลืองจะมีอายุตั้งแต่ 25 วันขึ้นไปจนถึงประมาณ 70 วัน โดยโรคหัวเหลืองที่เกิดกับกุ้งอายุ 25-35 วัน มีลักษณะคล้ายกับโรคตายเดือนหรือโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่ความรุนแรงจะมากกว่า คือโรคตายเดือนเมื่อผสมยาปฏิชีวนะกับอาหารให้กุ้งกินร่วมกับการจัดการเรื่องคุณภาพน้ำและพื้นบ่อให้ดีขึ้น มักจะแก้ปัญหาได้ แต่กุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองนั้นพบว่ากุ้งตายอย่างรวดเร็วโดยใช้เวลา 2-3 วัน กุ้งจะตายหมดบ่อ

สำหรับโรคหัวเหลืองที่เกิดกับกุ้งอายุประมาณ 50-70 วัน ก่อนที่จะเริ่มมีกุ้งตายพบว่าการกินอาหารของกุ้งในบ่อจะเพิ่มขึ้นมากติดต่อกันหลายวัน หลังจากนั้นจะเริ่มพบมีกุ้งตาย โดยอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-3 วัน กุ้งอาจตายหมดบ่อ เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกชนิด พบว่าโรคหัวเหลืองทำให้กุ้งตายรวดเร็วและรุนแรงมากที่สุด และการแพร่กระจายในพื้นที่การเลี้ยงแต่ละแหล่งจะรวดเร็วมาก

4. โรคตายเดือน

สาเหตุของโรค

เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอ (*Vibrio* spp.) ซึ่งมีหลายชนิด และมักจะเกิดกับกุ้งที่ปล่อยในช่วงเดือนแรก โรคตายเดือนมักเกิดกับบ่อที่มีการปล่อยกุ้งในขณะที่สีน้ำยังไม่ขึ้น น้ำใสมีขี้แดด ประกอบกับมีปริมาณอินทรีย์สารที่พื้นบ่อมาก สาเหตุการเกิดโรคจะคล้ายกับโรคเรืองแสงหรือหัวเหลือง แต่ความรุนแรงน้อยกว่า

ลักษณะอาการ

กุ้งที่ป่วยมักจะขึ้นมาอยู่ตามขอบบ่อหรือลอยตามผิวน้ำ มีตะกอนสกปรกเกาะตามผิวตัว ตัวหลวม หางบวม หรือกร่อน บางตัวอาจมีจุดขาวหรือดำตามเปลือก นอกจากนี้ยังพบตะกอนเกาะตามเหงือกอีกด้วย หากมีการนำกุ้งป่วยมาแยกเชื้อแบคทีเรียจะพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียกลุ่มวิบริโอเป็นจำนวนมาก

5. โรคเรืองแสง

สาเหตุของโรค

โรคเรืองแสงเกิดจากเชื้อ วิบริโอ ฮาวีอาย (*Vibrio harveyi*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ เติบโตได้ทั้งในสภาวะมีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เชื้อนี้สามารถให้แสงสีเขียวแกมเหลืองออกมา โดยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดจากเอ็นไซม์ ลูซิเฟอเรส (Luciferase) ซึ่ง

ทำให้เรืองแสงได้ในที่มืด ในน้ำที่มีปริมาณสารอินทรีย์มากเชื้อวิบริโอ ฮาวีอาย จะเพิ่มจำนวนตัวอย่างรวดเร็วในน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 10-40 พีพีที

ลักษณะอาการ

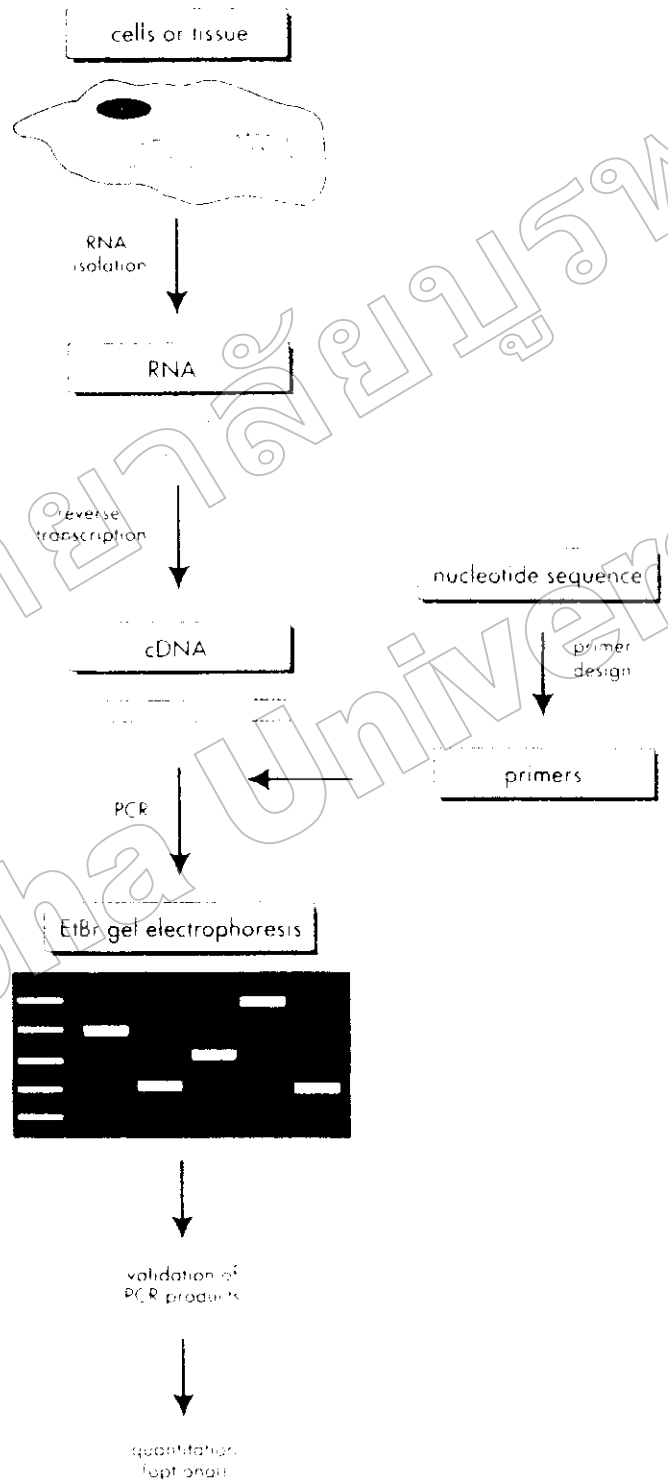
ปัญหาการเกิดโรคเรืองแสงของกุ้งในบ่อเลี้ยงพบได้ตั้งแต่ปล่อยลูกกุ้งในบ่อ 2 สัปดาห์จนถึงกุ้งใหญ่ ขึ้นกับการจัดการบ่อและสภาพของพื้นบ่อ แต่พบมากในกุ้งมีอายุประมาณ 30-60 วัน กุ้งที่ป่วยมักพบขึ้นมาเกยตามขอบบ่อหรือว่ายอยู่ที่ผิวน้ำ ซึ่งทำให้มองเห็นการเรืองแสงที่ส่วนหัวได้อย่างชัดเจนในเวลากลางคืน เมื่อนำกุ้งป่วยมาตรวจสอบโดยนำส่วนของตับ และตับอ่อนหรือนำเลือดกุ้งมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบแบคทีเรียท่อนสั้นเคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และเมื่อทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อทีซีบีเอส (TCBS agar) จะได้โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเป็นชนิดสีเขียว เมื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อในกุ้งป่วยพบว่าส่วนตับและตับอ่อนนั้นถูกทำลายอย่างรุนแรงทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติและอาหารที่สะสมไว้ในตับก็จะน้อยลง กุ้งเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด นอกจากพบว่าตับและตับอ่อนถูกทำลายแล้วพบว่าในลำไส้มีเซลล์ตายและมีอาการอักเสบอย่างชัดเจนเช่นกัน

เทคนิค RT nested-PCR (reverse transcription nested- polymerase chain reaction)

หลักการของเทคนิค RT-PCR

RT-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มขยาย gene ที่สนใจจากการใช้ RNA เป็นแม่แบบหรือแม่พิมพ์ (template) หลักการที่สำคัญ คือทำการสกัด RNA จากนั้นทำการเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA (complementary DNA)โดยกระบวนการ reverse transcription โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) เอนไซม์ชนิดนี้ทำงานโดยสามารถสร้างสาย DNA ได้จากทั้งแม่พิมพ์ที่เป็น DNA และ RNA โดยทั่วไปเอนไซม์ RT ที่ใช้ในงาน cDNA เป็นเอนไซม์ที่ได้มาจาก retroviruses (บริษัทกิบไทยจำกัด, 2546)

ขั้นตอนสำคัญของเทคนิค RT-PCR เริ่มต้นโดยการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์แล้วใช้ RNA นี้เป็นแม่พิมพ์ สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription ให้สังเคราะห์ cDNA จากนั้นจะใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer 2 สายที่สังเคราะห์มาเพื่อขยายตำแหน่งที่สนใจบน cDNA นั้น ผลิตผล PCR ที่ขยายจากจำนวน cDNA สามารถตรวจวิเคราะห์ในทำนองเดียวกันกับผลิตผล PCR จากเทคนิคพื้นฐาน โดยการวิเคราะห์ขนาดของผลิตผล PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และตรวจยืนยันโดยวิธี restriction digestion hybridization หรือ nucleotide sequencing (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรีอัตถทิพพหลคุณ, 2536)



ภาพที่ 2-3 ขั้นตอนของเทคนิค RT-PCR (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536)

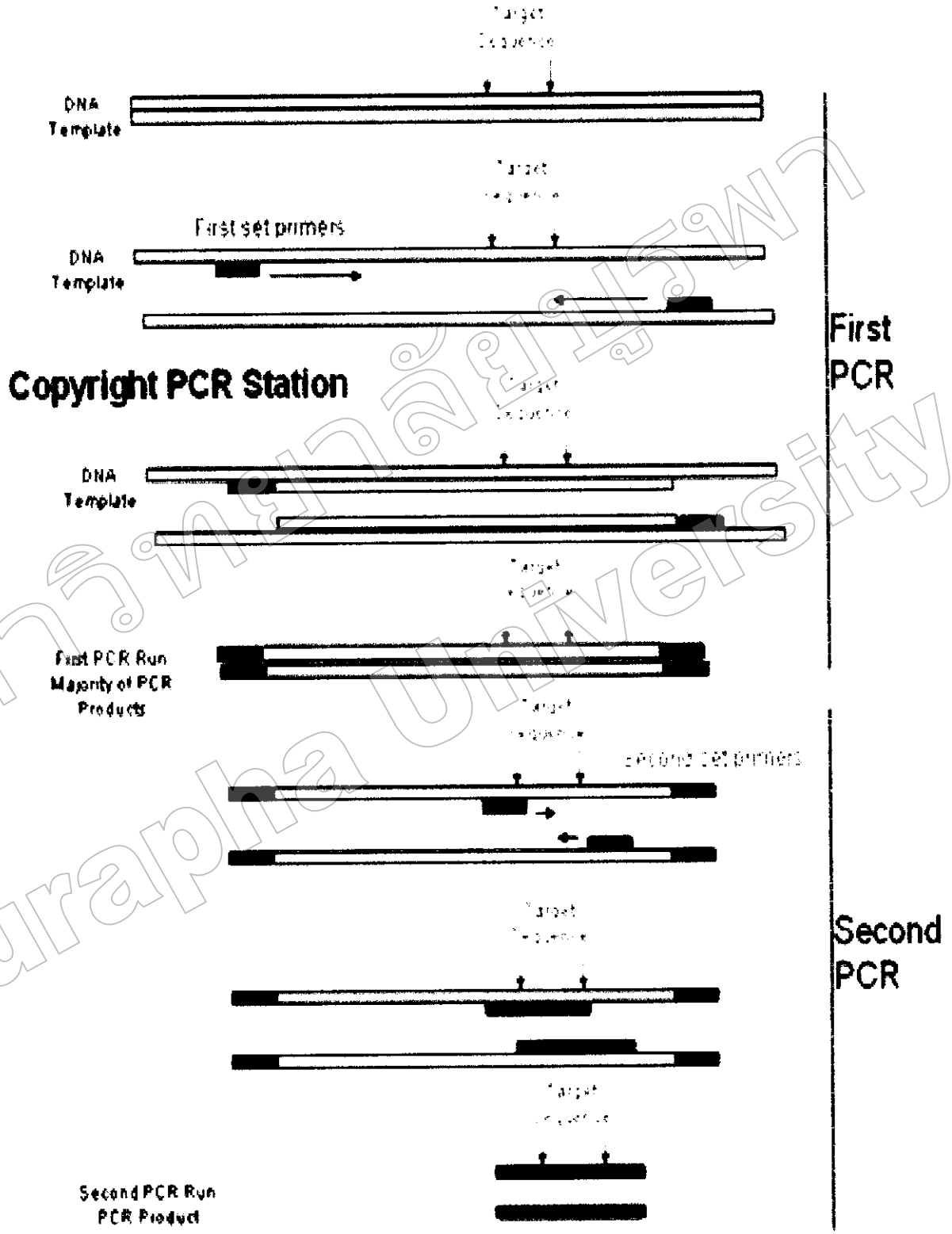
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หลักการของเทคนิค nested-PCR (nested- polymerase chain reaction)

การเพิ่มขยายจำนวน DNA เป้าหมาย (target DNA) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers 1 คู่ กับ DNA ทั้งหมดที่แยกสกัดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งตรวจซึ่งมี DNA อื่น ๆ ปนอยู่จำนวนมากนั้นมักจะให้ผลิตผลที่ต้องการในจำนวนที่น้อย จนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ติดตามด้วยการย้อมสีได้ ทั้งนี้ target DNA มีจำนวนน้อยมากปะปนอยู่กับ DNA ที่ไม่เกี่ยวข้องจำนวนมาก ทำให้ primer แต่ละสายมีโอกาสจับกับตำแหน่งที่เป็นเบสคู่สมบน target DNA ได้ยาก จึงเป็นผลให้ผลผลิตของ target DNA เพิ่มขยายได้จำนวนน้อย และส่วนใหญ่จะมีผลิตผลที่ไม่ต้องการปนมาด้วยค่อนข้างมาก

การดัดแปลงเทคนิค PCR พื้นฐานให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน target DNA ให้ได้ผลิตผลที่ต้องการเพิ่มมากขึ้นโดยที่ลดจำนวนผลิตผลที่ไม่จำเพาะให้เหลือน้อยที่สุด ทำได้โดยเทคนิค nested PCR ซึ่งเป็นปฏิกิริยา PCR 2 ขั้นตอน (two-step PCR) ด้วย primers 2 คู่ ได้แก่ bracket primers และ nested primers ในปฏิกิริยาช่วงแรกของ nested PCR จะใช้ bracket primers ซึ่งเป็น primers ที่อยู่รอบนอก target DNA และใช้ crude DNA ให้เกิดปฏิกิริยา PCR จำนวน 20-25 รอบ ทำให้ได้ผลิตผลที่มีลำดับ nucleotide ของ target DNA อยู่ภายในแต่มีขนาดยาวกว่า ซึ่งสัมพันธ์กับตำแหน่งของ bracket primers ที่ออกแบบไว้ จำนวนของผลิตผลจากปฏิกิริยา PCR ช่วงแรกนี้จะเทียบเท่ากับจำนวนผลิตผลที่เพิ่มขยายได้จากเทคนิค PCR พื้นฐานด้วย primers คู่เดียว ในปฏิกิริยาช่วงที่ 2 ของ nested PCR ทำได้โดยใช้ผลิตผลจากปฏิกิริยา PCR ช่วงแรกเป็นแม่พิมพ์และใช้ nested primers ซึ่งออกแบบให้มีลำดับ nucleotide สำหรับเพิ่มขยายให้ได้ผลิตผลของ target DNA อยู่ถัดเข้ามาด้านในจาก bracket primers ให้เกิดปฏิกิริยาจำนวน 25-30 รอบ จะทำให้ได้ผลิตผลของ target DNA มีความบริสุทธิ์สูงและได้จำนวนขยายเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันเทคนิค nested PCR ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรีอัตถทิพพหลคุณ, 2536)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-4 ขั้นตอนของเทคนิค nested PCR

ที่มา : http--www_pcrstation_com-images-nested-pcr_gif วันที่เข้าถึง 22/03/51

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kallaya *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาสาเหตุที่ทำให้กุ้งกุลาดำโตช้า แคระแกร็น ซึ่งพบตัวอย่าง 8 ตัวอย่างที่ทำการระบุไม่ได้ว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิดใด จึงทำการตรวจสอบโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ RNA ของไวรัส และนำมาวิเคราะห์ phylogenetic ปรากฏว่าไม่ใช่เชื้อไวรัสในกลุ่ม *Luteoviridae* และ *Barnaviridae* เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (TEM) พบลักษณะของไวรัสคือ มีขนาดประมาณ 25-30 นาโนเมตร ลักษณะรูปร่างคล้ายกับไวรัสในกลุ่ม *Luteoviridae* ซึ่งเป็นไวรัสที่ไม่มีเยื่อหุ้มอนุภาค (nonenvelope) และมีรูปร่างหลายเหลี่ยม (icosahedral particle) และจากการทำ *in situ* hybridization (ISH) พบว่าให้ผลบวกในต่อมน้ำเหลืองเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหัวใจ และตับของกุ้ง ผู้ศึกษาจึงได้ตั้งชื่อไวรัสตัวนี้ว่าไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ตามแหล่งที่พบไวรัสในครั้งแรกคือ อ.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในสัตว์ทะเลจำพวกไม่มีกระดูกสันหลังมาก่อน

เบญจมาศ ประทุมไทย (2549) ทำการศึกษาไวรัสแหลมสิงห์ในเนื้อเยื่อประสาทของกุ้งกุลาดำที่มีอาการโตช้า โดยวิธี *in situ* hybridization (ISH), RT-PCR และกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน TEM โดยทำการศึกษาแต่ละส่วนของเนื้อเยื่อประสาท (ตา สมอง ปมประสาทส่วนอก ปมประสาทส่วนท้อง และ เส้นประสาท) ซึ่งผลจากการทำ RT-PCR พบว่าทุกส่วนของเนื้อเยื่อประสาทของกุ้งโตช้าทุกตัวให้ผลบวกและบางตัวในกุ้งปกติ ผลจากการทำ ISH พบว่าให้ผลบวกทุกส่วนของเนื้อเยื่อประสาท และเมื่อสังเกตภายใต้ TEM พบไวรัสขนาด 25 นาโนเมตร ดังนั้นไวรัสที่พบในเนื้อเยื่อประสาทคือ LSNV และผลจาก ISH ให้ผลบวกในส่วนของ fasciculated zone (เส้นประสาทตา) เฉพาะในกุ้งโตช้า ไม่พบในกุ้งปกติ ดังนั้นการเกิดความผิดปกติที่ตาอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาโตช้าในกุ้งกุลาดำ

ระบิล รัตนพานี และนงลักษณ์ ตันติลีปิกร (2533) ได้รายงานสภาวะโรคที่เกิดจากเชื้อ MBV ในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนระยะโพสต์ลาวา 30 – 40 โดยทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาและจุลชีววิทยา คณะผู้วิจัยพบความผิดปกติของโรคอย่างมากที่บริเวณตับแต่ไม่พบรอยโรคที่อวัยวะอื่น และแบ่งระดับการเกิดโรคเป็น 3 ระดับตามความรุนแรงของตับที่เสียหายและปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจพบ คณะผู้วิจัยได้สรุปจากงานวิจัยดังกล่าวว่าการติดเชื้อ MBV ในกุ้งโตมักพบการติดเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ในขณะที่การติดเชื้อในกุ้งวัยอ่อนมักพบรอยโรคที่ตับเพียงอย่างเดียวแต่มีความรุนแรงมากจนทำให้กุ้งตายได้ ต่อมา Fegan *et al.* (2533) ได้ศึกษารอยโรคและพยาธิกำเนิดที่เกิดจากเชื้อไวรัส MBV ในกุ้งตัวอ่อน กุ้งระยะโพสต์ลาวาและกุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์ทางภาคใต้ของประเทศไทย และเสนอแนะถึงผลของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อความไวของกุ้งต่อโรคนี้

Flegel *et al.* (1997) พบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัส Hepatopancreatic Parvo-Virrus (HPV) กับอัตราการเจริญเติบโตช้าของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในฟาร์ม โดยการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาและพบว่าความรุนแรงจะมากขึ้นถ้ามีการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง MBV กับ HPV ต่อมา Flegel *et al.* (2001) ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้และพบว่ากุ้งกุลาดำ 400 ตัวจากฟาร์มเลี้ยงกุ้ง 12 ฟาร์มในประเทศไทยมีการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกันคือ MBV กับ HPV ในอัตราค่อนข้างสูงมีผลทำให้การเจริญเติบโตชะงักและกุ้งแคระแกร็น การติดเชื้อ HPV มีผลต่อกุ้งมากกว่าเชื้อไวรัส MBV และจากการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี PCR พบว่า 94 เปอร์เซ็นต์ ของกุ้งกุลาดำที่ตรวจมีการติดเชื้อจากไวรัสชนิดเดียว และ 79 เปอร์เซ็นต์ เป็นกุ้งที่มีการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด

ทินวรรธน์ ศรีสุข และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาการติดเชื้อ IHHNV ที่ก่อให้เกิดโรค RDS ในกุ้งขาวแปซิฟิกอายุ 73 วัน โดยพบว่ากุ้งมีอาการเปลือกพับย่นผิดรูปร่าง กรีบิดเบี้ยว แคระแกร็น จากการสุ่มตัวอย่างพบกุ้งที่มีอาการดังกล่าว 28.57 เปอร์เซ็นต์ โดยกุ้งที่แสดงอาการจะมีน้ำหนักตัวและความยาวเฉลี่ยตั้งแต่ฐานกรีจนถึงโคนหางน้อยกว่ากุ้งที่มีอาการปกติ และทำการตรวจวินิฉัยทางจุลพยาธิวิทยาพบลักษณะ Cowdry type-A inclusion bodies ที่เซลล์เหงือก, antennal gland และ nerve cord วินิจฉัยยืนยันด้วยวิธี PCR จากเนื้อเยื่อเหงือกให้ผลบวกต่อ IHHNV สรุปว่ากุ้งเกิดความผิดปกติจากเชื้อ IHHNV ที่ก่อให้เกิดโรค RDS ซึ่งมีรายงานในกุ้งขาวแปซิฟิกเป็นครั้งแรกในประเทศไทย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermo cycler (รุ่น Px 2 Thermal) (Bio-Active)
- เครื่อง UV Transiluminator (รุ่น Dolphin Series Image V.1)
- บีกเกอร์ 50, 100, 500, 1000 มิลลิลิตร
- ขวดวัดปริมาตร (Volumetic flask) 10, 50, 100, 1000 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต P2, P20, P100, P200, P1000
- ปิเปต 5, 10 มิลลิลิตร
- ไมโครทิวป์ (Microtube)
- คิวเวท (Cuvette)
- ไมโครเวฟ (Microwave)
- เครื่อง Centrifuge
- เวอร์เทก (Vortex)
- เครื่อง Autoclave
- ตู้ Oven
- ตู้เย็น
- ตู้แช่แข็ง
- กระดาษ Parafilm
- ปากคีบปลายแหลม
- กรรไกรปลายแหลม
- Tip ขนาด 0-10 ,0-200 ,100-1000
- โกร่งบดตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA
   - RNA extraction solution จาก Shrimp Biotechnology Business Unit, SBBU
   - Chloroform
   - Isopropanol
   - 75 % Ethanol
   - Diethyl pyrocarbonate (DEPC) จาก SBBU
   - น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว
2. สารเคมีที่ใช้ในการทำ RT nested-PCR จาก SBBU
   - First LSNV Master mix
   - Nested LSNV Master mix
3. สารเคมีที่ใช้ทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)
   - Agarose
   - Ethidium bromide solution
   - 1X TBE buffer pH 8.0
   - Loading dye
   - DNA marker ชนิด 100 bp DNA ladder

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งในจังหวัดจันทบุรี โดยแยกตัวอย่างกุ้งแต่ละบ่อไม่ปะปนกัน ใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิท เขียนรายละเอียดให้ชัดเจน แล้วแช่น้ำแข็ง หากไม่สามารถตรวจวิเคราะห์โรคได้ในทันทีที่ถึงห้องปฏิบัติการให้แช่แข็งตัวอย่างกุ้งทั้งตัว (Frozen whole specimens) ในน้ำแข็งแห้งหรือในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำกุ้งกุลาดำที่ได้มาตรวจวิเคราะห์โรคไวรัสแหลมสิงห์ ด้วยเทคนิค RT nested-PCR

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 การเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำในจังหวัดจันทบุรี

บ่อที่	อำเภอ/สถานที่	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	อายุกุ้ง (เดือน)
	ท่าใหม่		
1	เกษตรกร	5	3
2	เกษตรกร	5	3
3	เกษตรกร	5	3
4	เกษตรกร	5	3
5	เกษตรกร	5	3
6	เกษตรกร	5	3
7	เกษตรกร	5	3
8	เกษตรกร	5	3
9	เกษตรกร	3	3
10	เกษตรกร	3	3
11	เกษตรกร	3	3
12	เกษตรกร	3	3
13	เกษตรกร	3	3
14	เกษตรกร	3	3
15	ศูนย์วิจัย	8	3
16	ศูนย์วิจัย	15	3
17	ศูนย์วิจัย	20	3
18	ศูนย์วิจัย	8	3
19	ศูนย์วิจัย	6	3
20	คุ้งกระเบน	3	3
21	คุ้งกระเบน	3	3
22	คุ้งกระเบน	3	3
23	คุ้งกระเบน	2	3
24	เกษตรกร	4	3

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ ชลบุรี 20131

ตารางที่ 3-1 (ต่อ) แสดงการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำในจังหวัดจันทบุรี

บ่อที่	อำเภอ/สถานที่	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	อายุกุ้ง (เดือน)
	ท่าใหม่		
25	เกษตรกร	5	3
26	เกษตรกร	5	3
27	เกษตรกร	5	3
28	เกษตรกร	5	3
29	เกษตรกร	8	3
30	เกษตรกร	5	3
31	เกษตรกร	6	3
32	เกษตรกร	8	3
33	เกษตรกร	4	3
	แหลมสิงห์		
34	เกษตรกร	10	8
35	เกษตรกร	10	8
	รวม	201	

2. การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก หรือขาเดินจากกุ้งกุลาดำของแต่ละบ่อ มาบดรวมกันเพื่อรวมตัวอย่าง ให้ได้น้ำหนักของเนื้อกุ้งรวมกันประมาณ 25 มิลลิกรัม

3. การสกัด RNA จากกุ้งกุลาดำ

นำเนื้อเยื่อกุ้งที่บดแล้ว 25 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

↓

เติม RNA extraction solution ปริมาณ 750 ไมโครลิตร แล้วบดให้ละเอียด

↓

บ่มทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม chloroform ปริมาณ 200 ไมโครลิตร

↓

(ต่อ)

1635

ปั่นให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วบ่มทิ้งไว้ 3 นาที

↓

ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

↓

ดูดส่วนใสออกปริมาณ 200 ไมโครลิตร และย้ายใส่ eppendorf tube ใหม่

↓

ใส่ isopropanal ปริมาณ 500 ไมโครลิตร

↓

ปั่นให้เข้ากันด้วย Vortex ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

↓

ทิ้งส่วนใส ล้างด้วย 75 % ethanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร

ปั่นที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

↓

เทส่วนใส ทิ้งให้หลอดแห้งที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

↓

ละลายด้วย DEPC ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

↓

เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

↓

ดูดของเหลวมาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำกลั่น 250 เท่า

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร

เพื่อหาปริมาณ RNA

* สูตรคำนวณปริมาณ RNA = $\frac{\text{ค่า OD}_{260} \times 40 \times \text{dilution factor}}{1000}$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค nested-PCR

ปีเปต First LSNV Master mix ปริมาณ 13 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดสอบแบบผนังบาง (thin wall) ที่ใช้สำหรับงาน PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

↓

ใส่ตัวอย่าง RNA ถ้าเป็น positive control จะเป็น RNA ของเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ และ negative control คือน้ำกลั่น ปริมาณ 2 ไมโครลิตร

↓

นำใส่เครื่อง DNA Thermal Cycler (First PCR)
โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

Pre-denaturation temperature	50	องศาเซลเซียส	30	นาที	
	94	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	30	วินาที	25 รอบ (cycle)
Annealing	55	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Extension	68	องศาเซลเซียส	50	วินาที	
Post-extension temperature	68	องศาเซลเซียส	30	วินาที	

↓

เติม Nested LSNV Master mix ปริมาณ 15 ไมโครลิตร

↓

นำใส่เครื่อง DNA Thermal Cycler (Nested PCR)
โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้

↓

(ต่อ)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Pre-denaturation temperature	94	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	20	วินาที	25 รอบ (cycle)
Annealing	62	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Post-extension temperature	72	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
	68	องศาเซลเซียส	30	วินาที	

↓

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดยการแยก DNA บนแผ่นวุ้นเอกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้า

(Agarose gel electrophoresis)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

ผลการตรวจเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ ในกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิค RT nested-PCR ซึ่งใช้ชุดทดสอบ Farming Intelligence Tech. Corp. ของ Shrimp Biotechnology Business Unit, SBBU ได้ผลดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลการตรวจเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

บ่อที่	อำเภอ/ตำบล/ท่าใหม่	ผลบวก	ผลลบ	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	หมายเหตุ
1	เกษตรกร	+++		5	WSSV
2	เกษตรกร	+++		5	WSSV
3	เกษตรกร	+++		5	WSSV
4	เกษตรกร	+++		5	WSSV
5	เกษตรกร	+++		5	WSSV
6	เกษตรกร	+++		5	WSSV
7	เกษตรกร	+		5	WSSV
8	เกษตรกร	+		5	WSSV
9	เกษตรกร	++		3	WSSV
10	เกษตรกร		-	3	-
11	เกษตรกร	+		3	WSSV
12	เกษตรกร		-	3	-
13	เกษตรกร	+++		3	WSSV

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

บ่อที่	อำเภอ	ผลบวก	ผลลบ	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	หมายเหตุ
14	เกษตรกร	++		3	WSSV
15	ศูนย์วิจัย		-	8	WSSV
16	ศูนย์วิจัย		-	15	WSSV
17	ศูนย์วิจัย		-	20	WSSV
18	ศูนย์วิจัย		-	8	WSSV
19	ศูนย์วิจัย		-	6	WSSV
20	คุ้งกระเบน	+++		3	WSSV
21	คุ้งกระเบน		-	3	WSSV
22	คุ้งกระเบน		-	3	-
23	คุ้งกระเบน		-	2	-
24	เกษตรกร		-	4	WSSV
25	เกษตรกร		-	5	-
26	เกษตรกร		-	5	WSSV
27	เกษตรกร		-	5	-
28	เกษตรกร		-	5	WSSV
29	เกษตรกร		-	8	WSSV
30	เกษตรกร		-	5	-
31	เกษตรกร		-	6	-
32	เกษตรกร		-	8	-
33	เกษตรกร		-	4	WSSV
	แหลมสิงห์				
34	เกษตรกร		-	10	-
35	เกษตรกร		-	10	-
			รวม	201	

<u>หมายเหตุ</u> +++ = พบเชื้อ LSNV ที่มีระดับความรุนแรงมาก (Severe Infected)

++ = พบเชื้อ LSNV ที่มีระดับความรุนแรงปานกลาง (Moderate Infected)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

\+ = พบเชื้อ LSNV ที่มีระดับความรุนแรงเล็กน้อย (Light Infected)

\- = ผลลบ (negative) ไม่พบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์

WSSV = พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

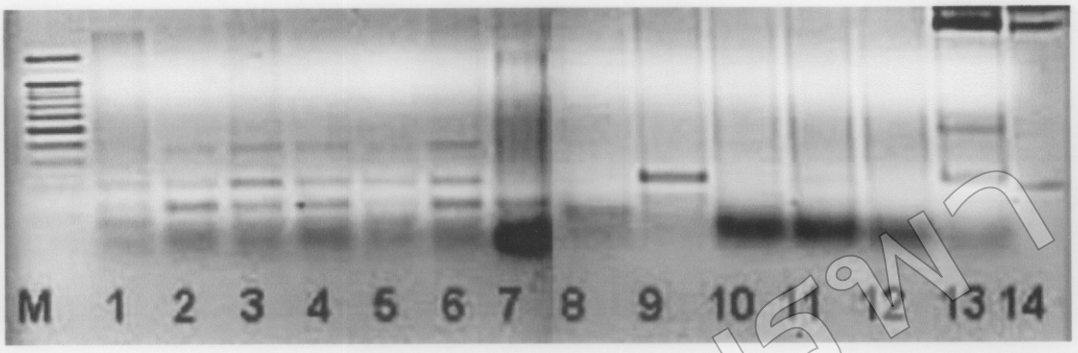
จากตารางที่ 4-1 พบว่าบ่อที่ 1-6, 13 และ 20 พบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ ระดับ Severe Infected คิดเป็น 22.86 เปอร์เซ็นต์

บ่อที่ 9 และ 14 พบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ ในกุ้งกุลาดำระดับ Moderate Infected คิดเป็น 5.71 เปอร์เซ็นต์

บ่อที่ 7-8 และ 11 พบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำ ระดับ Light Infected คิดเป็น 8.57 เปอร์เซ็นต์

บ่อที่ 10,12,15-19 และ 21-36 ไม่พบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ ในกุ้งกุลาดำ คิดเป็น 62.86 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 4-1 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

Lane M = DNA marker ขนาด 100 + 1500 คู่เบส

Lane 1-6 และ13 = พบเชื้อ LSNV ระดับ Severe Infected โดยปรากฏแถบ DNA ขนาด 600, 300 และ195 คู่เบส

Lane 9 และ 14 = พบเชื้อ LSNV ระดับ Moderate Infected โดยปรากแถบ DNA ขนาด 300 และ 195 คู่เบส

Lane 7-8 และ 11 = พบเชื้อ LSNV ระดับ Light Infected โดยปรากฏแถบ DNA ขนาด 195 คู่เบส

Lane 10 และ 12 = ให้ผลลบ (negative) ไม่มีการปรากฏแถบ DNA เป้าหมาย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผลการวิจัย

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ ในกุ้งกุลาดำจากบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรในจังหวัดจันทบุรีด้วยเทคนิค RT nested-PCR พบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำทั้งหมด 13 บ่อ จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ 35 บ่อ คิดเป็น 37.14 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 13 บ่อ ตั้งอยู่ในพื้นที่อำเภอท่าใหม่ จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าได้มีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสแหลมสิงห์เกิดขึ้น โดยมีการพบเชื้อชนิดนี้เพิ่มขึ้นใน อ.ท่าใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ไม่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อไวรัสนี้ และพื้นที่นี้ยังมีเกษตรกรที่นิยมเลี้ยงกุ้งกุลาดำอยู่มากกว่าในอำเภออื่นซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้มีการพบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในพื้นที่นี้มากที่สุด และจากพื้นที่การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบริเวณของ อ.ท่าใหม่ที่มีการพบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์นั้นสังเกตได้ว่า บ่อที่มีการพบเชื้อจะเป็นบ่อที่อยู่บริเวณใกล้ ๆ กัน มีการใช้น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่เดียวกัน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ แต่ก็มีปัจจัยต่าง ๆ ที่ยังต้องมีการศึกษาอีกมาก เช่น สายพันธุ์กุ้ง พาหะ ปัจจัยสิ่งแวดล้อม สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง เช่น เคย ปู ปลา และสัตว์น้ำวัยอ่อนอีกหลายชนิด ซึ่งการตรวจพบในครั้งนี้ก็ยังไม่สามารถบอกสาเหตุการแพร่ระบาดได้อย่างแน่ชัดเนื่องจากปัจจัยที่อาจมีผลต่อการก่อโรคนั้นมีมาก โดยข้อมูลที่ศึกษาและรายงานเกี่ยวกับเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ยังขาดข้อมูลอีกมาก อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่ากุ้งกุลาดำที่มีอาการแคระแกร็นนั้นเกิดจากเชื้อไวรัสแหลมสิงห์เพียงอย่างเดียว เพราะเชื้อไวรัสที่มีสาเหตุทำให้กุ้งมีอาการแคระแกร็นนั้นมีหลายชนิด โดยอาจเกิดจากเชื้อ MBV, HPV และ IHHNV ก็เป็นได้

การจากตรวจเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ด้วยวิธี RT nested-PCR สามารถแบ่งระดับการเกิดโรคเป็น 3 ระดับ โดยดูจากปริมาณเชื้อไวรัสที่ตรวจพบ ซึ่งสัมพันธ์กับการปรากฏของแถบของ DNA คือ ระดับ severe infected ปรากฏแถบ DNA ขนาด 600, 300 และ195 คู่เบส ระดับ moderate infected ปรากฏแถบ DNA ขนาด 300 และ195 คู่เบส ระดับ light infected โดยปรากฏแถบ DNA ขนาด 195 คู่เบส และถ้าให้ผลลบ (negative) จะไม่มีการปรากฏแถบ DNA เกิดขึ้น โดยการปรากฏแถบของ DNA 3แถบ (Severe Infected) นั้น เนื่องจากมีปริมาณไวรัสในระดับสูงมากกว่า 10^6 copies/reaction เมื่อมีปริมาณไวรัสลดลงจะปรากฏจำนวนแถบ DNA ลดลงด้วย โดยที่ระดับ

light infected จะมีปริมาณไวรัสอยู่ประมาณ 10^4 copies/reaction นอกจากนี้ การเพิ่มจำนวน DNA เป็นแบบ one-tube nested PCR โดย first RT-PCR จะเห็นแถบ DNA ที่ประมาณ 600 คู่เบส ดังนั้น เมื่อทำการเพิ่มจำนวน DNA ในรอบ nested PCR ถ้ามีปริมาณไวรัสมาก การจับของ primers (คู่ที่ 2) กับ target จะได้ปริมาณมาก (ประมาณ 200 คู่เบส) เพราะจำนวน template ในรอบนี้มีปริมาณมาก (one-tube PCR เท่ากับการเติม master mix ของ nested ลงในหลอดทดสอบแบบผนังบาง แรกของ first PCR product) เมื่อทำการแยก DNA บนแผ่นวุ้นเอกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้า จะเห็นเป็น double band ของการจับของ primer คู่ในเนื่องจาก แผ่นวุ้นเอกาโรส มีประสิทธิภาพในการแยกคู่เบสที่จำกัด

จากการทดลองสังเกตเห็นว่ากุ้งกุลาดำที่มีการติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์นั้นกุ้งจะมีการติดเชื้อของไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ร่วมด้วย โดยมีกุ้งกุลาดำที่มีการติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในทั้งหมด 13 บ่อ โดยทั้ง 13 บ่อนี้กุ้งกุลาดำมีอาการติดเชื้อตัวแดงดวงขาวร่วมด้วยเช่นกัน จากบ่อทั้งหมดที่มีการติดเชื้อจากไวรัสพบว่า 45.83 เปอร์เซ็นต์ ของกุ้งกุลาดำที่ตรวจมีการติดเชื้อไวรัสชนิดเดียวคือไวรัสตัวแดงดวงขาว และ 54.17 เปอร์เซ็นต์ เป็นกุ้งที่มีการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ซึ่งจากการติดเชื้อร่วมกันนี้อาจจะส่งผลให้มีการส่งเสริมกันให้เชื้อไวรัสมีความรุนแรงมากขึ้น โดยต้องมีการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Flegel *et al*. (1997) ที่ศึกษาการติดเชื้อของไวรัส HPV ในกุ้งกุลาดำและพบว่าความรุนแรงของโรคนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อร่วมกันกับ MBV ซึ่งไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการแคระแกร็นเช่นเดียวกับไวรัสแหลมสิงห์

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสนั้นมีอิทธิพลเกิดจากปัจจัย 3 สามประการคือ เชื้อโรค สิ่งแวดล้อม และสัตว์น้ำ โดยปัจจัยทั้ง 3 นี้มีส่วนสัมพันธ์กัน การเกิดโรคขึ้นได้นั้นจะเกิดความไม่สมดุลระหว่างปัจจัยทั้ง 3 (ไพบูลย์ โล่สุนทร, 2538) จากการค้นพบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในครั้งนี้ เกษตรกรต้องมีการจัดการในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ดี กำจัดปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจมีส่วนทำให้กุ้งกุลาดำสามารถที่จะติดเชื้อโรคได้ เนื่องจากยังไม่ทราบสาเหตุของการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสแหลมสิงห์อย่างแน่นอน เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงต้องมีการป้องกันเพื่อไม่ให้เชื้อโรคมีการแพร่ระบาดและไม่สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่ทำการเพาะเลี้ยงได้ ต้องมีการเฝ้าระวังติดตามการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ในกุ้งกุลาดำถึงแม้ว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้จะอยู่ในกลุ่มโรคที่ไม่ทำให้กุ้งกุลาดำมีการตายอย่างรวดเร็วหรือรุนแรง แต่โรคไวรัสแหลมสิงห์นั้นทำให้กุ้งกุลาดำมีการเจริญเติบโตช้า มีอาการแคระแกร็น ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงพบปัญหาการเลี้ยงกุ้งไม่ได้ขนาดตามที่ต้องการ และกุ้งในบ่อเดียวกันมีขนาดแตกต่างกันมาก และถึงแม้ว่ากุ้งที่พบเชื้อนั้นยังไม่มีการแสดงอาการเกิดขึ้นแต่ก็ควรมีการเฝ้าระวัง เนื่องจากเมื่อกุ้งมีอาการเครียดจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น สิ่งแวดล้อมมีการ

เปลี่ยนแปลง อาจทำให้กุ้งแสดงอาการเกิดขึ้น หรืออาจมีการยอมรับเชื้อชนิดอื่นเข้ามาได้ง่าย เช่น การยอมรับเชื้อไวรัส WSSV ได้ง่ายขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อราคากุ้งเป็นอย่างมาก การติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำนั้นก่อให้เกิดความเสียหาย การรักษาไม่สามารถที่จะทำได้ การที่สามารถตรวจพบและวินิจฉัยโรคตั้งแต่ระยะแรก ๆ เป็นวิธีทางเดียวในการจัดการกับโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ มาช่วยในการวินิจฉัย ซึ่งทำได้สะดวกและรวดเร็ว

อย่างไรก็ตามการจัดการที่เหมาะสม เช่น เตรียมบ่อเลี้ยงให้เหมาะสมเพื่อกำจัดของเสียที่หมักหมมจากการเลี้ยงกุ้งในช่วงที่ผ่านมา หลีกเลี่ยงฤดูที่เสี่ยงต่อการเกิดโรค ไม่ปล่อยกุ้งในอัตราที่มีความหนาแน่นมากเกินไป (มนตรี ไชยชาติ, 2546) เป็นแนวทางหนึ่งที่สำคัญในการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดในตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงกุ้ง อีกทั้งมีการพัฒนาวิธีการป้องกัน และแก้ไขปัญหาการเกิดโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำด้วยวิธีที่ถูกต้อง และเหมาะสมก็จะเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้

สรุปผลการวิจัย

มีการตรวจพบเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem Sing Virus, LSNV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากบ่อเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรในจังหวัดจันทบุรีโดยพบเชื้อใน อ.ท่าใหม่ ทั้งหมด 13 บ่อ จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ 35 บ่อของพื้นที่ อ.ท่าใหม่และ อ.แหลมสิงห์โดยคิดเป็น 37.14 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนบ่อเลี้ยงกุ้งทั้งหมดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคไวรัสแหลมสิงห์ จากปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย อาทิ เช่น ปัจจัยสิ่งแวดล้อม การจัดการรอบบริเวณบ่อเพาะเลี้ยง เชื้อโรค และกุ้ง เป็นต้น เพื่อประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรค

2. ควรมีการศึกษาการติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์จากพาหะชนิดต่าง ๆ ที่อาจส่งผลต่อการแพร่ระบาดของเชื้อ เช่น กุ้ง ปู ปลา ชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการประเมินสาเหตุการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ไปสู่กุ้งกุลาดำ

3. ควรมีการศึกษาการก่อโรคไวรัสแหลมสิงห์ในพื้นที่ต่าง ๆ เพิ่มขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บรรณานุกรม

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. (2547). *อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย*. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: บริษัทเมจิคพับบริเคชั่นจำกัด.

ทินวรรธน์ ศรีสุข, วิษณุ บุญญาวิวัฒน์, ประศาสน์ ประยงค์ทรัพย์, วิจิตรา วรรณโวหาร และสกุณา พัฒนกุลอนันต์. (2545). *การตรวจพบไวรัส Haematopoietic Necrosis Virous (IHHNV) ที่ก่อให้เกิดโรค Runt Deformity Syndrome (RDS) ในกุ้งขาวแปซิฟิก (Litopenaeus vannamel) ในประเทศไทย*: รายงานสัตว์ป่วย. 8 หน้า.

บริษัทกิบไทยจำกัด. *Workshop 2003 การอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Basic Techniques in Nucleic Acid Analysis*. กรุงเทพฯ: กิบไทย, 2546.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. (2545). *Aquaculture*: กุ้งกุลาดำ. เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี. 35 หน้า.

เบญจมาศ ประทุมไทย. (2549). *การศึกษาแหลมสิงห์ไวรัสในเนื้อเยื่อประสาทของกุ้งกุลาดำ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์กายวิภาคศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. 66 หน้า.

ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ. (2531). *เทคนิคการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ*. พิมพ์ครั้งที่ 1: 91 หน้า.

ประจวบ หลำอุบล. (2530). *ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 237 หน้า.

ประจวบ หลำอุบล. (2537). *สรีระวิทยาของกุ้ง*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 311 หน้า.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. (2545). *ศาสตร์ของกุ้งขาว ลิโทพีเนียส แวนนาไม*. วารสารสัตว์น้ำ ปีที่ 14 ฉบับที่ 161. หน้า 109-112.

ไพบูลย์ โล่สุนทร. (2538). *ระบาดวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 504 หน้า.

มนตรี ไชยชาติ. (2546). *การติดเชื้อก่อโรคตัวแดงดวงขาวของลูกกุ้งกุลาดำ และลูกกุ้งขาว*. ปัญหาพิเศษ, ภาควิชาวาริชศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี. 38 หน้า.

ระบิล รัตนพานี และนงลักษณ์ ตันติลีปิกร. (2533). สภาวะโรคไวรัส MBV ในกุ้งกุลาดำวัยอ่อน. วารสารโรคสัตว์น้ำ *13(1)*: 77-81.

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ. (2536). *ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology*. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 208 หน้า.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สุมนา คงสม. (2535). *การศึกษาการติดเชื้อโมโนดอนบาคูโลไวรัสและแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 124 หน้า.

สำนักรักษาเสถียรภาพสินค้าเกษตร. (2544). *สถานการณ์การส่งออกกุ้งกุลาดำ.*กรมการค้าภายใน

Dall, W. (1957). A revision of the Australian species of Penaeidae (Crustacea Decapoda : Penaeidae). *Australian Journal of marine and Freshwater research, 18(2),* 136-231.

Fegan, D.F, T.W. Flegel, ศิริพร ศรีอุไรรัตนา และมนัสชัย ไวยครุฑ. (2533). การศึกษาโมโนดอนแบคูโลไวรัสในภาคใต้ของไทย. *วารสารการประมง* 43(5), 371-378.

Flegel, T.W., S. Sriurairatana, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim and B. withyaehumnaruk. (1997). *Progress in characterization and control of yellow-head virus of Penaeus monodon.* Shrimp Biotechnology in Thailand (BIOTEC Publication 2/2540). P. 71-78.

Flegel, T.W., T. Pasharawipas, L. Nielsen, V. Thamavit and S. Kongtim. (2001). *Effects of hepatopancreatic parvovirus (HPV) Monodon baculovirus (MBV) and multiple viral infections on cultivated shrimp in Thailand.* In The 3rd National Symposium on Marine Shrimp. P. 48-63.

Sritunyalucksana K., S. Apisawetakan, A. Boon-nat, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel. (2005). A new RNA virus found in black tiger shrimp *Penaeus monodon* from Thailand. *Virus Research. 118*, P. 31-38.

Motoh H. (1981). *Studies of the fisheries biology of the Giant tiger prawn, Penaeus monodon in the Philippines*. Southeast Asian Fisheries Development center, tig bauan, Lloilo, Philippines.

Platon, R. (2002). Mangrove friendly shrimp culture technique: research for Thailand เข้าถึงได้จาก http: www.aquachallenge.org. (วันที่สืบค้นข้อมูล 20 กุมภาพันธ์ 2551).

Tinker, S.W. (1965). *Pacific Crustacea, an illustrated handbook on the reef-dwelling crustacea of Hawaii and the South Seas.* Charles E. Tuttle Compagny: Publishers Rutland, Vermont & Tokyo, Japan: 134, P. 1-52.

http--www_pcrstation_com-images-nested-pcr_gif (วันที่สืบค้นข้อมูล 22 มีนาคม 2551).

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวพัชราภรณ์ น้อยผล
วัน เดือน ปี เกิด	19 พฤศจิกายน พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลอานันทมหิดล จังหวัดลพบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	35/465 หมู่ที่ 6 ต.เขาสามยอด อ.เมือง จ.ลพบุรี

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2543	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนพระนารายณ์ จ.ลพบุรี
พ.ศ. 2546	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพิบูลวิทยาลัย จ.ลพบุรี
พ.ศ. 2550	วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคโนโลยีทางทะเล สาขาเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ผลงานการร่วมกิจกรรม

พ.ศ. 2551	- ฝึกอบรมบุคลิกภาพ ณ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
พ.ศ. 2550	- ฝึกงานด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี - ฝึกงานด้านเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกาะสีชัง ชลบุรี
พ.ศ. 2547	- นิสิตวิทยากร ณ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลมหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University