การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) ที่ติดเชื้อโรคหางขาว

HISTOPATHOLOGICAL CHANGES STUDY OF WHITE TAIL DISEASE INFECTED IN GIANT FRESHWATER PRAWN (*MACROBRACHIUM ROSENBERGII* DE MAN) POST LARVAE

ศุภมาศ ศรีวงศ์พุก
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อโรคหางขาวจาก โรงเพาะฟักอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิด *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (*Mr*NV) และ Extra Small Virus (XSV) จะมีกล้ามเนื้อสีขาวขุ่นคล้ายสีน้ำนมที่บริเวณส่วนหลัง ด้านท้อง หรือปลายส่วนหาง พบ inclusion bodies (เป็นลักษณะที่บ่งบอกว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัส) จำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่ชัดเจนที่สุด 2 ลักษณะคือ inclusion body ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์ที่ตายแล้ว ย้อมติดสีชมพู (acidophilic intranuclear inclusion) หรือมีลักษณะแบบ Cowdry type A และ inclusion body ที่เกิดขึ้นในส่วนของไซโตพลาสซึมซึ่งย้อมติดสีน้ำเงิน (basophilic cytoplasmic inclusion) นอกจากนี้ยังพบการตายกล้ามเนื้อ (muscle necrosis) บริเวณมัดกล้ามเนื้อที่ส่วนหลัง ส่วนท้อง และส่วนหาง

คำสำคัญ : พยาธิสภาพเนื้อเยื่อ ลูกกุ้งก้ามกราม โรคหางขาว

ABSTRACT

Histopathological changes of White Tail Disease infected with *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (*Mr*NV) and Extra Small Virus (XSV) in Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) post larvae was studied in the hatchery from Amphor Song Pae – Nong, Supanburi Province. There were two types of inclusion bodies in their hepatopancreas ; acidophilic intranuclear inclusion or Cowdry type A and basophilic cytoplasmic inclusion. There were also areas of necrosis in the striated muscle of the dorsal, appendages of abdomen and the tail.

Keywords: Histopathological changes, Giant freshwater prawn post larvae,

Macrobrachium rosenbergii De Man, White Tail Disease

บทนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยเฉพาะเพศผู้ เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ ในปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในพื้นที่ภาคกลางประมาณ 80,000 ไร่ ประกอบด้วยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งประมาณ 5,000 ราย โดยเฉพาะในจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม และจังหวัดราชบุรี ผลผลิตกุ้งก้ามกรามประมาณร้อยละ 70 ใช้สำหรับการบริโภคภายในประเทศ และมีการส่งออกประมาณร้อยละ 30 ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปเป็นผู้ซื้อรายใหญ่

ตั้งแต่ปี 2523 ซึ่งเป็นปีเริ่มต้นของการดำเนินการส่งเสริมและขยายการเพาะเลี้ยงกุ้งของกรมประมง (ธีรพันธุ์ ภูคาสวรรค์, 2523) และจากนั้นเป็นต้นมาก็ได้มีการปรับปรุงแก้ไขและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามให้เจริญก้าวหน้ามากขึ้นเป็นลำดับ อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่เป็นอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามก็คือ การเกิดโรค โดยเฉพาะในช่วงระยะอนุบาลลูกกุ้ง ในปี พ.ศ. 2529-2531 การอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามเกิดปัญหาหลังจากลูกกุ้งเริ่มค่ำจนกระทั่งค่ำหมด หรือในช่วงที่ลูกกุ้งมีอายุตั้งแต่ 13 วัน จนถึงอายุ 35 วัน ปัญหาที่เกิดขึ้นคือกุ้งเป็นโรคตัวขาว ตัวสีชมพู กุ้งตายไม่ทราบสาเหตุ และไม่พบเชื้อโรค ตลอดจนกุ้งไม่ลอกคราบ กุ้งไม่โต ซึ่งมีผลทำให้อัตราการรอดต่ำ (โสภา อารีรัตน์ และสมเกียรติ์ กาญจนาคาร, 2531)

โรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการพัฒนาและขยายธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอย่างมาก สำหรับในประเทศไทยในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมามีลูกกุ้งก้ามกรามเป็นโรคและตายเป็นจำนวนมากในทุกพื้นที่ จากปัญหาเรื่องโรคดังกล่าวข้างต้นทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามที่ผลิตออกมามีไม่เพียงพอกับจำนวนความต้องการของเกษตรกร นอกจากนั้นเมื่อนำลูกกุ้งที่เหลือรอดไปเลี้ยงในบ่อ กุ้งบางส่วนเป็นโรคตาย ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ประสบปัญหาการขาดทุน เนื่องจากยังมีการวิจัยถึงสาเหตุการตายของลูกกุ้งที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อโรคดังกล่าวในหลายพื้นที่ในช่วงที่ผ่านมายังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้นในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะช่วยให้ค้นพบสาเหตุและแนวทางการป้องกันปัญหาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อโรคหางขาวแก่เกษตรกรต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคหางขาว

อุปกรณ์

1. ลูกกุ้งก้ามกรามระยะ post-larva ที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัสโรคหางขาว

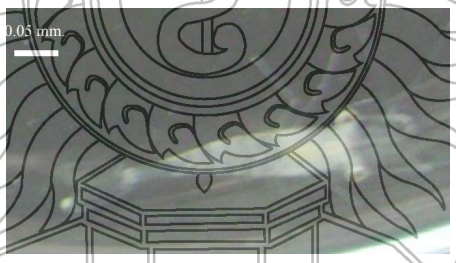
2. น้ำยา Davidson's fixative
3. ขวดแก้วมีฝาปิดสำหรับเก็บรักษาตัวอย่าง
4. Hematoxylin และ Eosin (H&E)
5. กล้องจุลทรรศน์แสง
6. กระจกสไลด์
7. แผ่นปิดกระจกสไลด์ (cover glass)

วิธีการ

นำตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัสโรคหางขาว จากโรงเพาะฟักลูกกุ้งในอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์สาเหตุของเชื้อโดยวิธี RT - PCR ตามวิธีการของ Sahual Hameed *et al.* 2004. ไปดองในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปผ่านขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างตามวิธีการของ Bell and Lightner (1988) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงต่อไป

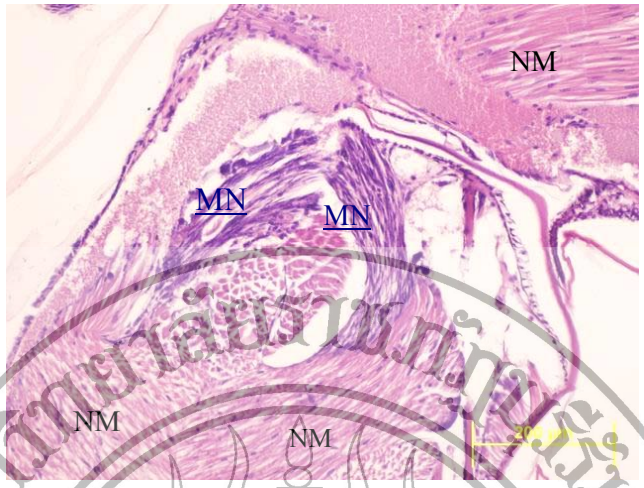
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่าลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคหางขาว (White tail disease หรือ WTD) จากการติดเชื้อไวรัสชนิด *M*-NV และ XSV มีลักษณะลำตัวสีขาวขุ่น (ภาพ 1)

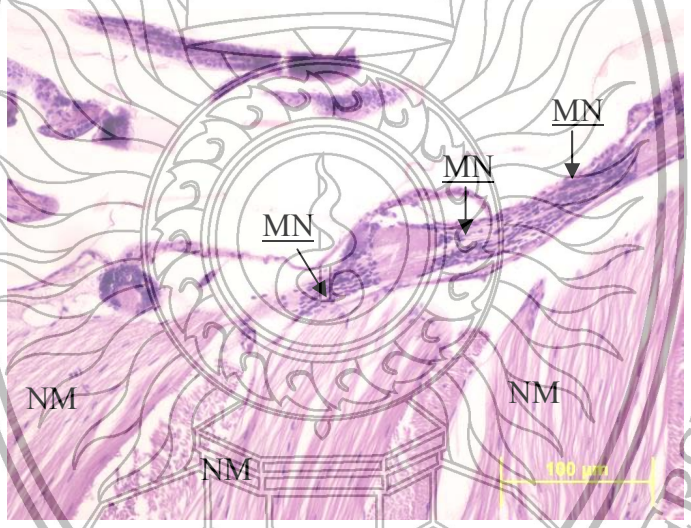


ภาพ 1 ลักษณะของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วย มีลำตัวสีขาวขุ่น

เมื่อนำลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเหล่านี้มาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบการเปลี่ยนแปลงในอวัยวะต่าง ๆ ดังนี้ คือ พบกล้ามเนื้อตาย (muscle necrosis) กระจายอยู่เป็นส่วน ๆ โดยเฉพาะมัดกล้ามเนื้อที่บริเวณลำตัว (ภาพ 2) ที่ส่วนท้อง (ภาพ 3) และที่ส่วนของระยางค์ต่าง ๆ (ภาพ 4) ของลูกกุ้ง จะเห็นนิวเคลียสของกล้ามเนื้อลายติดสีน้ำเงินเข้มจำนวนมาก จากการย้อมสีด้วยฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน (H&E) แตกต่างจากกล้ามเนื้อปกติซึ่งนิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินแต่จางกว่า และอยู่ห่าง ๆ กันทำให้มองเห็นเฉพาะในส่วนของไซโตพลาสซึมซึ่งจะติดเฉพาะสีชมพูอย่างชัดเจน (ภาพ 4) และพบว่าบริเวณกล้ามเนื้อที่เกิดการตายเหล่านี้จะมี hemocyte แทรกตัวเข้ามาเพิ่มเป็นจำนวนมาก

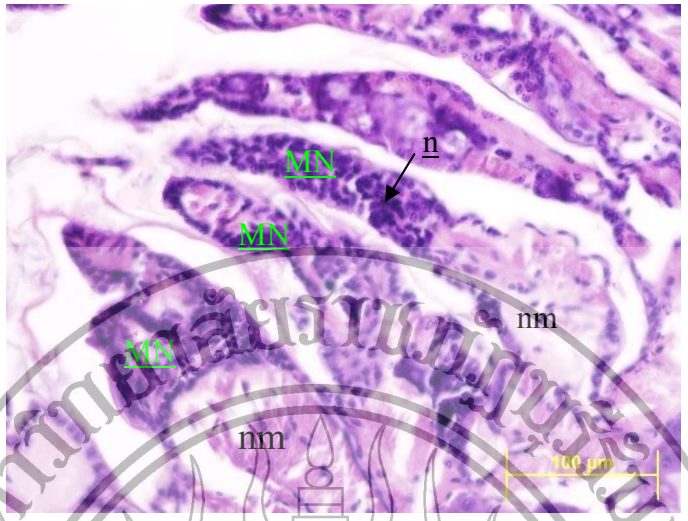


ภาพ 2 กล้ามเนื้อบริเวณลำตัวที่เกิดการตาย (MN) แทรกตัวรวมอยู่กับกล้ามเนื้อที่ปกติ (NM) (H&E; bar = 200 µm)



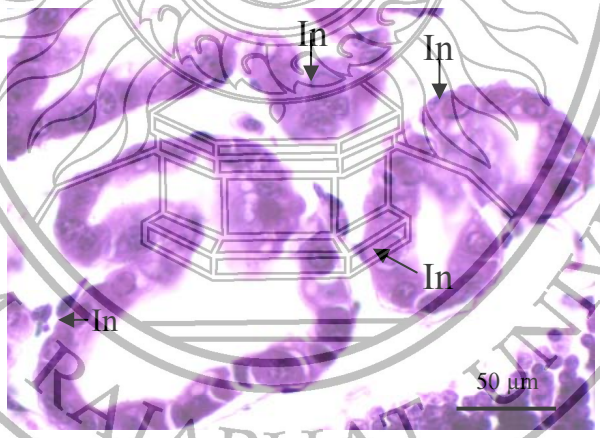
ภาพ 3 กล้ามเนื้อบริเวณด้านท้องที่เกิดการตาย (MN) แทรกตัวรวมอยู่กับกล้ามเนื้อที่ปกติ (NM) (H&E; bar = 100 µm)

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ BURIRAM RAJABHAT UNIVERSITY

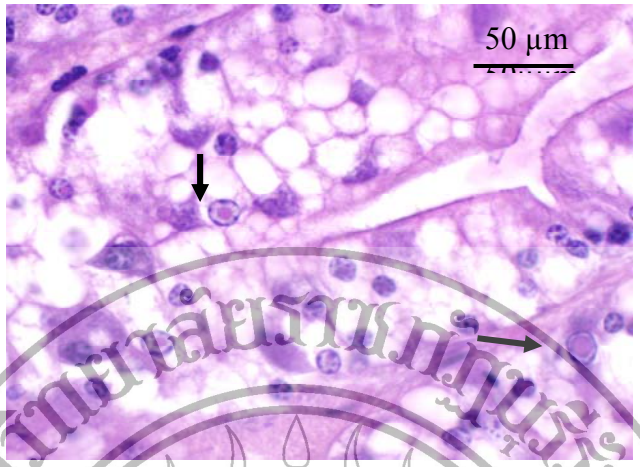


ภาพ 4 ภาพขยายกล้ามเนื้อบริเวณระยางค์ที่เกิดการตาย (MN) จะเห็นนิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม (n) แทรกตัวรวมอยู่กับกล้ามเนื้อที่ปกติ (NM) ซึ่งเห็นเป็นสีชมพู (H&E; bar = 100 µm)

นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อเยื่อส่วนของตับและตับอ่อนมีขนาดเล็กลง (atrophy) มีปริมาณเม็ดไขมันน้อยมาก (minimal lipid) ภายในเซลล์บุผิวของท่อตับและตับอ่อนพบ inclusion bodies ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบ คือ แบบแรกเป็น inclusion body ย้อมติดสีม่วงของ H&E ที่พบอยู่ภายในไซโตพลาสซึม (basophilic cytoplasmic inclusion body) (ภาพที่ 5) และแบบที่ 2 มีลักษณะแบบ Cowdry type A คือ จะมีช่องว่างใสโดยรอบ inclusion ซึ่งอยู่ภายในนิวเคลียส (intranuclear inclusion) (ภาพที่ 6)



ภาพ 5 ลักษณะพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน (hp) ของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยพบ basophilic cytoplasmic inclusion bodies (In) จำนวนมากแทรกตัวอยู่ภายในเซลล์ (H&E; bar = 50 µm)



ภาพ 6 ภาพขยายลักษณะของ inclusion bodies แบบ Cowdry type A (ศรชี้) จำนวนมากที่พบภายในตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วย (H&E; bar = 50 µm)

โรคหางขาว (White tail disease หรือ WTD) มีรายงานการพบในปี ค.ศ. 1997 ใน Guadeloupe (Arcier *et al*., 1999) หลังจากนั้นพบใน Martinique (French West Indies) ประเทศอินเดีย (Salin and Nair, 2003) ประเทศไต้หวัน (Tung *et al*., 1999) ประเทศจีนในจังหวัด Zhejiang, Jiangsu, Guangdong และ Shanghai (Qian *et al*., 2003) และในประเทศไทย (Yoganandhan *et al*., 2005) โรคหางขาวนี้สร้างความเสียหายให้กับลูกกุ้งก้ามกรามใน โรงเพาะฟักโดยลูกกุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของลูกกุ้งที่ติดเชื้อมีอาการกล้ามเนื้อสีขาวโดยเฉพาะบริเวณหาง (Sahul Hameed *et al*., 2004) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (*Mr*NV) ซึ่งมีรูปร่างแบบ icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) เป็น single strand RNA (ssRNA) ไวรัสมีขนาด 26-27 นาโนเมตร และชนิดที่สองคือ Extra small virus (XSV) มีขนาด 14-16 นาโนเมตร (Qian *et al*., 2003) แต่ความสัมพันธ์ของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด (Bonami *et al*., 2005) มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไวรัสทั้ง 2 ชนิด โดยในกลุ่มที่มีไวรัส *Mr*NV ในสัดส่วนที่มากกว่า XSV ปรากฏว่ากุ้งก้ามกรามแสดงอาการกล้ามเนื้อขาว แต่ในกลุ่มที่มีไวรัส *Mr*NV ในสัดส่วนที่น้อยกว่า XSV ปรากฏว่ากุ้งก้ามกรามแสดงอาการกล้ามเนื้อขาวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อโรคหางขาว มีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิด *Mr*NV และ ไวรัส XSV คือ พบ inclusion bodies จำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่ชัดเจนที่สุด โดยลักษณะของ inclusion bodies 2 ลักษณะบริเวณตับและตับอ่อน จากการ ติดเชื้อโรคดังกล่าวมีความแตกต่างจากการติดเชื้อของไวรัสชนิดอื่น คือ inclusion body ที่

พบในนิวเคลียสของเซลล์ที่ตายแล้ว ย้อมติดสีชมพู (acidophilic intranuclear inclusion) หรือมีลักษณะแบบ Cowdry type A และ inclusion body ที่เกิดขึ้นในส่วนของไซโตพลาสซึมซึ่งย้อมติดสีน้ำเงิน (basophilic cytoplasmic inclusion) นอกจากนี้ยังพบการตายกล้ามเนื้อ (muscle necrosis) บริเวณมัดกล้ามเนื้อที่ส่วนหลัง ส่วนท้อง และส่วนหาง จึงสามารถนำลักษณะของ inclusion bodies ที่บริเวณตับและตับอ่อน เป็นลักษณะที่บ่งชี้ว่าการติดเชื้อไวรัสนั้น ๆ มีสาเหตุมาจากไวรัสชนิด *Mr*NV และ ไวรัส XSV ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยสาเหตุของการติดเชื้อโรคหางขาวในลูกกุ้งก้ามกรามได้

ข้อเสนอแนะ

เกษตรกรหรือผู้ประกอบการที่ทำการเพาะฟักลูกกุ้งก้ามกราม ควรมีการตรวจสอบหรือคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่ปลอดเชื้อไวรัส *Mr*NV และ ไวรัส XSV ทุกครั้งที่นำมาทำการเพาะฟักลูกกุ้ง เนื่องจากโรคนี้สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่พันธุ์สู่ลูกได้ ก่อให้เกิดความเสียหายและการขาดทุนของผู้ประกอบการ

เมื่อพบว่ามีการระบาดของโรคหางขาวในลูกกุ้งก้ามกรามเกิดขึ้นภายในโรงเพาะฟัก ควรทำการกำจัดลูกกุ้งที่ป่วยด้วยการเผาซาก และฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่าง ๆ ทุกชิ้นที่ใช้ในการเพาะอนุบาลลูกกุ้งด้วยน้ำยาฟอร์มาลินทุกครั้ง เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคระบาดร้ายแรง สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว และไม่มียาในการรักษา เนื่องด้วยเกิดจากการติดเชื้อไวรัส

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเกษตรกรผู้ทำฟาร์มเพาะฟักลูกกุ้งก้ามกราม ในอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามเพื่อประกอบการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ธีรพันธุ์ ภูคาสวรรค์. (2523). บทบรรณาธิการกุ้งก้ามกราม. **วารสารการประมง** 33 (5): 511-518.

โสภา อารีรัตน์ และ สมเกียรติ์ กาญจนาคาร. (2531). **ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคในกุ้งก้ามกรามกับคุณสมบัติของน้ำในบ่ออนุบาล**. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 77/ 2531. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 12 น.

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

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

Bonami,. J.R., Z Shi, D. Qian and J. Sri Widada. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virons and characterization of *Mr*NV as a new type of nodavirus. **J. Fish Dis**. 28: 23-31.

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

Sahul Hameed, A.S., K. Yokanandhan, J. Sri Widada and J.R. Bonami. (2004). Studies on the occurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) and extra small virus like-particles (XSV) associated with white tail disease (WTD) of *Macrobrachium rosenbergii* in India by. **Aquaculture**. 238: 127-133.

Salin, K.R. and Nair C.M. (2003). **Emerging diseases of giant freshwater prawn in India: a potential threat to sustainability.** p. 57. *In* Book of Abstracts, Freshwater Prawns 2003, International Symposium on Freshwater Prawn, 20-30 August; 2003, Kochi, India, Kerala Agriculture University, Thrissur, India.

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

Yoganandhan, K., J. Sri Widada, J.R. Bonami and A.S. Sahul Hameed. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachim rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. **J. Fish Dis.** 28: 65-69.