



ผลของกรดอะมิโนลิวูลินิกต่อระดับเอทีพีในเซลล์ตับกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*
ที่ติดเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

The Effects of 5-Aminolevulinic Acid on ATP Levels In Hepatopancreas
of The Pacific Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Infected
by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

สุธาทิพย์ คงปล้อง

Suthathip Kongplong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Agricultural Science and Technology
Prince of Songkla University

2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ผลของกรดอะมิโนลิวูลินิกต่อระดับเอทีพีในเซลล์ตับกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*
ที่ติดเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)
The Effects of 5-Aminolevulinic Acid on ATP Levels In Hepatopancreas
of The Pacific Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Infected
by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

สุธาทิพย์ คงปล้อง

Suthathip Kongplong

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Agricultural Science and Technology
Prince of Songkla University

2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของกรดอะมิโนลิวลินิกต่อระดับเอทีพีในเซลล์ตับกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ที่ติดเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

ผู้เขียน นางสาวสุธาทิพย์ คงปลั่ง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงแชติตา กาญจนโสภา)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปฐิมา เพิ่มพูนพัฒนา)

.....กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงแชติตา กาญจนโสภา)

.....

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์เกียรติคุณ บุญเสริม วิทย์ชำนาญกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รพีพรรณ วานิชวิริยกิจ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เถกิง วงศ์ศิริโชติ)

รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงแขทิตา กาญจนโสภณ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....
(นางสาวสุธาทิพย์ คงปล้อง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุธาทิพย์ คงปล้อง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของกรดอะมิโนลิวูลินิกต่อระดับเอทีพีในเซลล์ตับกึ่งขาว *Litopenaeus vannamei* ที่ติดเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

ผู้เขียน นางสาวสุธาทิพย์ คงปล้อง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

ปีการศึกษา 2565

บทคัดย่อ

Hepatopancreatic microsporidiosis เป็นโรคกึ่งที่เกิดจากการติดเชื้อรา *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) ที่พบการแพร่ระบาดอย่างหนักในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม *Litopenaeus vannamei* ของประเทศไทย กุ้งที่ติดเชื้อ EHP จะกินอาหารลดลง มีภาวะกล้ามเนื้อฝ่อ โตช้า และทยอยตาย กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (aminolaevulinic acid, 5-ALA) เป็นกรดอะมิโนที่ไม่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน มีส่วนช่วยในการสร้างพลังงานภายในเซลล์ด้วยการเพิ่มการสร้างฮีโมโปรตีนซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์พลังงาน (ATP) ผ่านการขนส่งอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรีย งานวิจัยครั้งนี้มีสมมติฐานว่าการให้กุ้งที่ติดเชื้อ EHP กินอาหารเสริม 5-ALA อาจลดอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ EHP ได้ นำกุ้งขาวแวนนาไมจากบ่อเลี้ยงเชิงพาณิชย์ที่มีอาการติดเชื้อ EHP มาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 40 ลิตร ที่ความเค็ม 30 ppt แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 4 กลุ่ม แต่ละกลุ่มให้อาหารกุ้งผสม 5-ALA ที่ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 15, 30 และ 60 ppm เลี้ยงกึ่งนาน 21 วัน ผลการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับ 5-ALA ที่ 60 ppm มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด และมีมวลน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกุ้งในกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ผลการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของตับกึ่งในกลุ่มที่ได้รับ 5-ALA ที่ 60 ppm พบว่าตับมีอาการ atrophic tubule ลดลง รวมถึงพื้นที่แควคิวโอลภายใน B-cell มีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) แสดงถึงการทำงานของตับที่ดีขึ้น เมื่อตรวจปริมาณการติดเชื้อ EHP ในตับด้วย semi-quantitative PCR พบว่าการติดเชื้อเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ 5-ALA และพบการติดเชื้อ EHP ในตับเมื่อตรวจด้วยเนื้อเยื่อวิทยา ตรวจหาระดับ ATP ในตับกึ่ง พบว่ากุ้งในกลุ่ม 30 และ 60 ppm มีความเข้มข้นของ ATP เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าการเสริม 5-ALA ในอาหารกึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่มีการติดเชื้อ EHP ในระดับฟาร์มเชิงพาณิชย์

คำสำคัญ: กรดอะมิโนลิวูลินิก 5-ALA hepatopancreatic microsporidiosis การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล กุ้งโตช้า การตายเรื้อรัง *Enterocytozoon hepatopenaei*

Thesis Title The effects of 5-aminolevulinic acid on ATP levels in hepatopancreas of the pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* infected by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

Author Miss Suthathip Kongplong

Major Program Agricultural Science and Technology

Academic Year 2022

Abstract

Hepatopancreatic microsporidiosis, the shrimp disease caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection, has been widely spread in farmed *Litopenaeus vannamei* in Thailand. The symptoms include decreased feeding, muscle waste, slow growth, and chronic mortality. Since 5-aminolaevulinic acid (5-ALA), a non-protein amino acid, has been known to enhance ATP production in the cell through the increased formation of hemoproteins in the electron transport complex of mitochondria, it was hypothesized that providing 5-ALA to EHP-infected shrimp might reduce the mortality caused by the infection. Naturally EHP-infected *L. vannamei* were randomly sampled from a commercial shrimp pond that showed signs of hepatopancreatic microsporidiosis. The shrimp samples were reared under 30 ppt seawater in 40-L plastic tanks, divided into four groups; each receiving commercial pellets supplemented with different doses of 5-ALA: 0 (control), 15, 30, and 60 ppm. After 21 days of the experiment, it was found that the shrimp receiving 5-ALA at 60 ppm survived at a rate significantly ($p < 0.05$) higher than that of other groups, and had a significant increase in biomass, compared with that of the control group. Histology of the hepatopancreas of the 60-ppm group revealed significantly ($p < 0.01$) less percentage of atrophic epithelium and larger areas of the vacuoles of the B-cells, suggesting improved hepatopancreatic functions. The levels of the EHP load in the hepatopancreas as revealed by semi-quantitative PCR were increasing in a dose-related manner of 5-ALA supplement, with EHP being detected histologically. The ATP levels in the hepatopancreas of the 30- and 60-ppm groups were significantly ($p < 0.01$) higher than that of the control group. Further tests in the commercial-scaled farms are required to find out if the 5-ALA supplement is beneficial to the EHP-infected *L. vannamei*.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, 5-ALA, hepatopancreatic microsporidiosis, marine shrimp culture, slow growth, chronic mortality, *Enterocytozoon hepatopenaei*

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความร่วมมือและความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.ดวงแขพิฑา กาญจนโสภาก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาและทำวิจัย ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ บุญเสริม วิทย์ชำนานุกูล ที่ให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือในการศึกษาข้อมูล การเก็บตัวอย่าง การเขียนงานวิจัย ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาดูด้วยความเอาใจใส่ ทำให้การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ลุล่วงด้วยดี และขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.ปฎิมา เพิ่มพูนพัฒนา และ รศ. ดร. รพีพรรณ วานิชวิริยกิจ ที่เสียสละเวลาเป็นประธานและกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเสนอแนะแนวทางการเขียนเพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสาขาความเป็นเลิศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา ขอขอบพระคุณศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ที่ให้การเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และอื่นๆ ที่มีความจำเป็นต่อการดำเนินงานวิจัยวิทยานิพนธ์ รวมถึงเจ้าหน้าที่ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลาง ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยตลอดจนให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ บริษัท ไทยเนียน กรู๊ป จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์สำหรับการวิจัย และขอบคุณฟาร์มกึ่ง AquaAcademy Farm (AAF) ตำบลวัง อำเภอบางขัน จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่ให้ใช้อุปกรณ์และสถานที่ในเพาะเลี้ยงกุ้งในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ตลอดมา ขอขอบคุณพี่ ๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจทุกครั้งที่เกิดปัญหาในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่คอยให้กำลังใจตลอดการศึกษา

สุธาทิพย์ คงปลั่ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(5)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญรูปภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 การตรวจเอกสาร	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	26
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	27
2.1 วิธีดำเนินการ	27
2.1.1 การเลี้ยงและการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไม	27
2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตับกุ้ง	28
2.1.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ	29
2.1.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	29
2.1.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	29
2.1.6 การตรวจสอบความเข้มข้น ATP ในตับกุ้ง	32
2.1.7 การตรวจสอบทางพยาธิวิทยา	34
2.1.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	35
2.2 วัสดุและอุปกรณ์	35
บทที่ 3 ผลการวิจัย	37
3.1 การศึกษาผลของ 5-ALA ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว	37
3.2 การศึกษาพยาธิวิทยาของตับกุ้งที่ได้รับอาหารเสริม 5-ALA	39
3.3 การตรวจการติดเชื้อ EHP ในตับกุ้ง	41
3.4 การตรวจระดับความเข้มข้น ATP ในตับกุ้ง	44

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 วิเคราะห์ผลการทดลอง	45
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม	48
ภาคผนวก	57
ประวัติผู้เขียน	69

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	โรคที่สำคัญและเชื้อก่อโรคในกุ้งทะเลโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เป็นกุ้งเพาะเลี้ยง	7
ตารางที่ 2	วิธีการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ EHP ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล	14
ตารางที่ 3	การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล	22
ตารางที่ 4	ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจการติดเชื้อ EHP ในตับกุ้ง	30
ตารางที่ 5	ส่วนประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยาพีซีอาร์	31
ตารางที่ 6	ส่วนผสมหลักของปฏิกิริยาการวิเคราะห์ความเข้มข้น ATP	32
ตารางที่ 7	ส่วนผสมของสารละลายสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน ATP	34
ตารางที่ 8	การเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้ง <i>L. vannamei</i> ที่ติดเชื้อ EHP ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA	37
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์ atrophic tubule และค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ vacuole ภายใน B-cell ของตับกุ้ง <i>L. vannamei</i> ที่ติดเชื้อ EHP ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA	39

สารบัญญรูปภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะกุ้งขาวแวนนาไม	3
ภาพที่ 2	ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว <i>Litopenaeus vannamei</i>	4
ภาพที่ 3	ภาพทางจุลกายวิภาคของ hepatopancreas ของกุ้ง	6
ภาพที่ 4	ลักษณะเนื้อเยื่อตับกุ้งที่พบว่ามี การติดเชื้อ EHP	9
ภาพที่ 5	ลักษณะการแตกแขนงของ EHP การเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและการแพร่เชื้อของ EHP	10
ภาพที่ 6	สปอร์และพลาสโมเดียมของ EHP ในเนื้อเยื่อตับด้วยการทำ squash mount	12
ภาพที่ 7	ภาพเนื้อเยื่อตับกุ้งถูกตรึงบนแผ่นพาราฟิล์ม	13
ภาพที่ 8	เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ EHP ย้อมด้วยวิธี Chromotrope และวิธี ISH	13
ภาพที่ 9	เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ของการตรวจเชื้อ EHP ด้วยวิธี nested PCR	16
ภาพที่ 10	การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเมื่อมีสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน	19
ภาพที่ 11	การสังเคราะห์ 5-ALA ด้วยกระบวนการทางเคมี	24
ภาพที่ 12	กระบวนการทางชีวภาพในการสังเคราะห์ 5-ALA	25
ภาพที่ 13	การเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้ง <i>L. vannamei</i> ที่ติดเชื้อ EHP ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA	38
ภาพที่ 14	พยาธิสภาพของตับกุ้งที่ติดเชื้อ EHP ที่ได้รับอาหารเสริม 5-ALA	40
ภาพที่ 15	เปอร์เซ็นต์ atrophic tubule และค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ vacuole ภายใน B-cell ของตับกุ้ง <i>L. vannamei</i> ที่ติดเชื้อ EHP ที่ซึ่งได้รับอาหารเสริม 5-ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ๆ	40
ภาพที่ 16	เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของตัวอย่างตับกุ้งที่ได้รับอาหารเสริม 5-ALA	42
ภาพที่ 17	ความเข้มของแบนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยา nested PCR ในกุ้งที่ติดเชื้อ EHP ที่เสริม 5-ALA	43
ภาพที่ 18	พยาธิวิทยาของตับกุ้งที่ติดเชื้อ EHP และได้รับสารเสริม 5-ALA	43
ภาพที่ 19	ความเข้มข้นของ ATP ในตับกุ้ง <i>L. vannamei</i> ที่ติดเชื้อ EHP และได้รับสารเสริม 5-ALA	44

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อราในสกุล *Enterocytozoon* เป็นเชื้อที่มักพบและก่อโรคในสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เชื้อราจะเข้าทำลายอวัยวะตับกึ่งแทบทุกชนิดรวมทั้งกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ในประเทศไทยพบการติดเชื้อรา EHP ในวงกว้างและพบการระบาดรุนแรงเพิ่มขึ้น (Chaijarapong, 2021) มีรายงานการติดเชื้อ EHP ว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในเซลล์ตับกึ่งชนิด M-cell (Midget cell) และ F cell (Fibrillar cell) สูงกว่าเซลล์ตับกึ่งชนิดอื่น (Nima et al., 2022) ซึ่งเซลล์ทั้งสองชนิดทำหน้าที่หลักในการสร้างโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ย่อยอาหาร ฮีมาไซยานิน โปรตีนจดจำเชื้อก่อโรค และเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial peptide) (Angthong et al., 2007; Hu and Leung, 2007; Wang et al., 2009; Tassanakajon et al., 2013; Yang et al., 2018) เนื่องจากเชื้อรา EHP อาศัยภายในเซลล์เจ้าบ้านและไม่มีไมโทคอนเดรีย เชื้อราจึงต้องอาศัยพลังงาน (ATP) ที่ผลิตได้จากไมโทคอนเดรียของเซลล์เจ้าบ้านเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม

กุ้งที่ติดเชื้อ EHP จะไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่กุ้งโตช้าทำให้กุ้งแตกไซต์ ต่อมากุ้งจะปล่อยขี้กุ้งที่เป็นสีขาวลอยเหนือน้ำและจะทยอยตายในที่สุด เรียกโรคกุ้งที่แสดงอาการดังกล่าวว่า โรคขี้ขาว ซึ่งนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มไม่เชื่อว่าโรคขี้ขาวเกิดจากเชื้อ EHP แต่น่าจะเกิดจากการที่กุ้งติดเชื้อ *Vibrio* spp. ซ้ำเติม หากกุ้งไม่มีการติดเชื้อซ้ำเติม กุ้งที่ติดเชื้อ EHP อย่างเดียวอาจจะไม่เป็นโรคขี้ขาว (Sriurairatana et al., 2014) โรคขี้ขาวเป็นอาการของกุ้งที่แสดงให้เห็นหลังจากกุ้งติดเชื้อ EHP ไประยะเวลาหนึ่งแล้ว เนื่องจากการตรวจพบสปอร์ของเชื้อราจำนวนมากในขี้ขาวจากกุ้ง (Tang et al., 2016) กุ้งที่ติดเชื้อรา EHP เซลล์ตับจะถูกทำลาย ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยอาหาร รวมถึงเก็บสะสมอาหาร ทำให้กุ้งอ่อนแอ รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง เนื่องจากกุ้งไม่สามารถสร้างโปรตีนฮีมาไซยานิน และเปปไทด์ต่อต้านต่อเชื้อก่อโรค ทำให้กุ้งถูกเชื้ออื่นเข้าทำลายซ้ำเติมได้ง่าย การติดเชื้อ EHP ในกุ้งที่เพาะเลี้ยงนั้นได้สร้างปัญหาให้แก่เกษตรกรอย่างมาก เพราะการโตช้าของกุ้งเป็นการสูญเสียค่าใช้จ่ายโดยไม่มีผลตอบแทนกลับมาอย่างคุ้มค่า เกษตรกรที่ประสบปัญหาโรคขี้ขาวในกุ้งนี้มักต้องจับกุ้งขายก่อนเวลาอันควรเพื่อไม่ให้ขาดทุน

การที่กุ้งติดเชื้อ EHP อาจเกิดจากกุ้งได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์เชื้อรา หรือเกิดการปนเปื้อนในโรงเพาะฟัก (vertical transmission) ซึ่งอาหารที่ใช้ในการอนุบาลลูกกุ้งมักมีการตรวจรับรองว่าไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ EHP ด้วยวิธี PCR แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าอาหารจะปราศจากเชื้อรา เนื่องจากการอนุบาลลูกกุ้งในโรงเพาะฟักในช่วงเวลาสั้นๆ มักมีระบบการจัดการและการบำบัดน้ำทะเลที่ดี ด้วยปัจจัยเหล่านี้จึงอาจมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการงอกของสปอร์ (Aldama-Cano et al., 2018) นอกจากนี้การติดเชื้อ EHP อาจเกิดจากการเลี้ยงในบ่อดิน (horizontal transmission) ดังนั้น การลด

การปนเปื้อนเชื้อราจึงต้องอาศัยการบำบัดน้ำด้วยคลอรีน หรือโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (ความเข้มข้น 15 พีพีเอ็ม) หรือการปรับความเป็นด่างของน้ำทะเลให้ได้ pH 11 (Aldama-Cano et al., 2018) แต่วิธีการบำบัดน้ำจำนวนมากทำให้เกิดการสะสมสารเคมีในตะกอนดิน และเพิ่มค่าใช้จ่ายของเกษตรกร ทำให้ได้ผลกำไรลดลง ในทางปฏิบัติวิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยมใช้ จึงจำเป็นต้องหาวิธีการอื่นที่สามารถลดความเสียหายของกุ้งที่ติดเชื้อ EHP และจากข้อเท็จจริงที่ว่าเชื้อรา EHP ไม่มีไมโทคอนเดรียจึงไม่สามารถสร้าง ATP ได้ ทำให้ต้องใช้ ATP จากเซลล์เจ้าบ้าน หากสามารถกระตุ้นการสร้าง ATP ของเซลล์เจ้าบ้านให้เพิ่มขึ้น เพื่อให้เซลล์เจ้าบ้านสามารถเติบโตได้เป็นปกติ ร่วมกับการจัดการน้ำและสิ่งแวดล้อมไม่ให้มีการปนเปื้อนเชื้อรา ด้วยวิธีการนี้อาจจะช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ EHP ลงได้

5-อะมิโนลีวูลินิก (5-ALA) เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการสังเคราะห์ฮีม (haem) ซึ่งฮีมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีนหลายชนิด (haemoprotein) เช่น ฮีโมโกลบินและฮีโมไซยานินที่อยู่ในน้ำเลือดทำหน้าที่ช่วยจับออกซิเจน และฮีมยังเป็นองค์ประกอบของไซโตโครมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง ATP ที่เกิดจากขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) ในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิต 5-ALA ภายในเซลล์โดยใช้สารตั้งต้น succinyl CoA และ glycine (Fujii et al., 2017) 5-ALA สามารถกระตุ้นการทำงานของไซโตโครมในกระบวนการหายใจของเซลล์ ส่งผลให้เกิดการสร้าง ATP ภายในเซลล์ได้เพิ่มขึ้น (Möbius et al., 2010) เมื่อกุ้งติดเชื้อ EHP เซลล์จะถูกเชื้อราดึงเอา ATP ไปใช้ หากสามารถเพิ่มการสร้าง ATP ของตัวกุ้งด้วยการเสริม 5-ALA ในอาหารกุ้ง อาจช่วยลดผลกระทบจากการที่กุ้งโตช้าเนื่องจากสูญเสีย ATP และส่งเสริมภูมิคุ้มกันภายในของกุ้งต่อเชื้อก่อโรค มีรายงานวิจัยพบว่า การเสริม 5-ALA ช่วยกระตุ้นการสร้างโปรตีนต้านต่อจุลินทรีย์ให้เพิ่มขึ้น และลดอาการตายด่วนที่เกิดจากโรค acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) ที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (Pedrosa-Gerasmio et al. 2018; 2019) นอกจากนี้พบว่าการเสริมอาหารกุ้งขาวด้วย 5-ALA ส่งเสริมจำนวนประชากรแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (Pedrosa-Gerasmio et al., 2020) จึงเป็นไปได้ว่าการเสริม 5-ALA จะช่วยลดการเกิดโรคซัซิวในกุ้งที่ติดเชื้อซ้ำเติมได้ งานวิจัยยังพบว่า 5-ALA กระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น (Pedrosa-Gerasmio et al. 2018; 2019) ซึ่งกุ้งที่ติดเชื้อ EHP ทำให้กุ้งตายเนื่องจากกระบวนการลอกคราบของกุ้งผิดปกติ เกิดจากความไม่สมดุลของฮอร์โมน และระดับเกลือแร่ภายในเซลล์ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และคาร์บอนเนต ซึ่งส่งผลต่อกลไกในระดับเซลล์จากหลักการและเหตุผลที่กล่าวมาจึงนำมาสู่หัวข้อของงานวิจัยในครั้งนี้

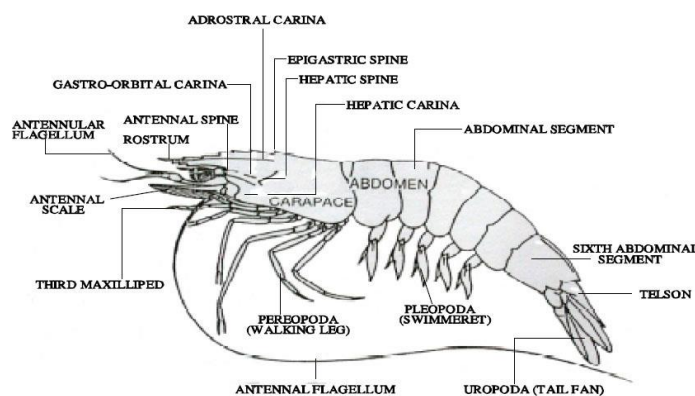
1.2 การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออก จากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนเหนือของเปรู กุ้งขาวแวนนาไมเป็นกุ้งทะเลที่ประเทศไทยนำเข้ามาเพื่อใช้เลี้ยงทดแทนกุ้งกุลาดำที่ประสบปัญหาโรค

ระบาดและโตช้า ปัจจุบันเกษตรกรไทยเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมแทนกุ้งกุลาดำแล้วเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในปี 2563 ประเทศไทยมีการส่งออกกุ้งขาวแวนนาไม เท่ากับ 114,398.93 ตัน มูลค่า 34,096.17 ล้านบาท หรือ 76.53 เปอร์เซ็นต์ และ 76.68 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งทะเลทั้งหมด ตามลำดับ โดยประเทศไทยมีตลาดหลักส่งออกอยู่ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น จีน เกาหลีใต้ (จิตรลดา, 2563)

กุ้งขาวแวนนาไม (Pacific white shrimp) ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* การจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน มีดังนี้ Order: Decapoda Class: Crustacea Suborder: Natantia Family: Penaeidae Genus: *Litopenaeus* Species: *vannamei* กุ้งขาวแวนนาไม ลำตัวมี 8 ปล้องสีขาว ออกใหญ่เคลื่อนไหวรวดเร็ว ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกริยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือกหัวสั้นกรีสสูง ปลายกริแคบ ส่วนของกริมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กริด้านบนมี 8 ฟันกริด้านล่างมี 2 ฟัน เปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง มีหนวดสีแดงยาว 2 เส้น ขาเดินมีสีขาว มีขาว่ายน้ำ 5 คู่มีสีขาวข้างในที่หลากหลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบ และ 1 กริหาง (ภาพที่ 1) หากินได้ทุกระดับความลึกของน้ำ ลอกคราบเร็วทุก ๆ สัปดาห์ ไม่หมกตัว ชอบน้ำกระด้างที่มีความ มีนิสัยที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง ตื่นตกใจง่าย เป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งในระบบธรรมชาติ และระบบกึ่งหนาแน่นโดยมีระดับน้ำประมาณ 1.0-1.5 เมตร (สมพร, 2552)



Morfology of white shrimp

ภาพที่ 1 ลักษณะกุ้งขาวแวนนาไม

ที่มา: Dugassa and Gaetan (2018)

ลักษณะเฉพาะของกุ้งชนิดนี้ที่สังเกตเห็นเด่นชัด คือลำตัวขาวใส เปลือก (exoskeleton) ไม่มีสีและใส (colorless and transparent) ขาเดิน (walking legs) มีสีขาว ปลายหางสีแดง กริ (rostrum) มีฟันด้านบน 8 ซี่ และด้านล่าง 2 ซี่ ความยาวของกริจะยาวกว่าลูกตาไม่มากนัก (ภาพที่ 2)



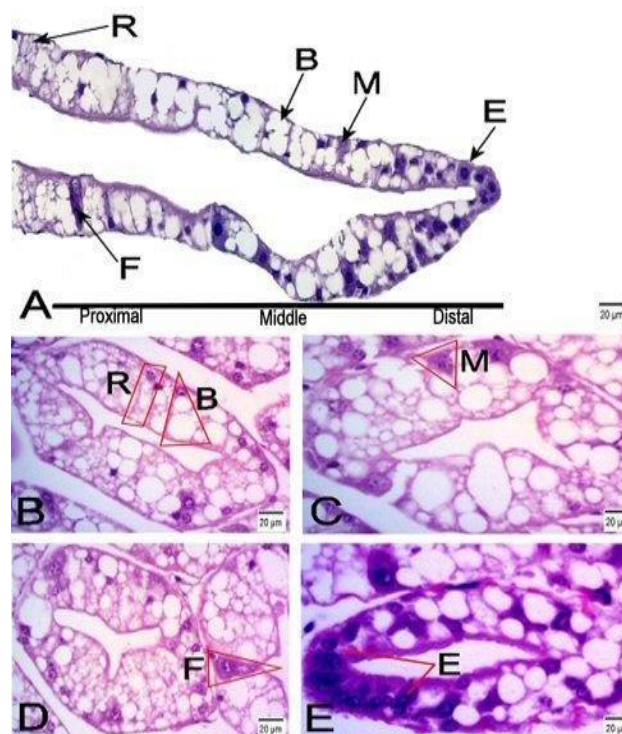
ภาพที่ 2 ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* a) แสดงลักษณะกรี (rostrum) มีฟันด้านบน 8 ซี่ และด้านล่าง 2 ซี่ มีปลายหางสีแดง เปลือก (exoskeleton) ไม่มีสีและใส b) แสดงลักษณะขาเดิน (walking legs) มีสีขาว

ที่มา: นิรยฮานนะห์ (2563)

อวัยวะหนึ่งที่สำคัญมากในกุ้งขาว และในกุ้งทุกชนิด คือ ตับ (hepatopancreas) อวัยวะนี้มีหน้าที่สำคัญในการ (1) สร้างน้ำย่อย หรือ enzyme เพื่อย่อยอาหาร (2) สะสมอาหารที่ย่อยแล้ว (3) สร้าง hemocyanin ซึ่งเป็น protein ที่ใช้ในการ “ขนส่ง” oxygen ไปยังเซลล์ต่าง ๆ ทั่วร่างกาย (4) สร้าง vitellin เพื่อส่งไปที่ oocytes ในรังไข่ (ovary) สำหรับแม่กุ้งในขณะที่กำลังสร้างความสมบูรณ์ของรังไข่ (ovarian maturation) (5) สร้างสารที่เป็นภูมิคุ้มกันให้แก่กุ้ง และ (6) หน้าที่อื่น ๆ ที่ยังคงต้องศึกษาต่อไป ตับกุ้งนี้ยังเป็นอวัยวะที่เป็นอวัยวะเป้าหมาย (target organ) ของเชื้อโรคต่าง ๆ ของกุ้ง ดังนั้นการตรวจสอบความผิดปกติของตับจึงเป็นเรื่องสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้ง วิธีการตรวจสอบที่มีอยู่ในปัจจุบัน และที่เป็นการตรวจสอบที่สามารถทำได้จริงในเชิงปฏิบัติ (practical method) คือการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope, LM) และการตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเซลล์ตับของกุ้งที่ทำมานานกว่า 50 ปีนั้น พบว่าอวัยวะนี้ประกอบด้วยท่อเล็ก ๆ (tubule) ที่แตกแขนงออกไปมากมายและขดรวมกันเป็นก้อนกลม โดยพื้นฐานทางเนื้อเยื่อวิทยาของตับจึงประกอบด้วย epithelial cells ที่ล้อมรอบ lumen และอีกด้านหนึ่งของ epithelial cells คือ basement membrane ที่แยก epithelial cells ออกจาก hemolymph ใน epithelial cells มีเซลล์ชนิดต่าง ๆ อยู่ 5 ชนิด คือ E-cell (embryonic cell), R-cell (resorptive cell), B-cell (blister-like cell), F-cell (fibrillar cell) และ M-cell (Midget cell) (Hu et al., 2007; Nunes et al., 2014) หน้าที่ของเซลล์แต่ละชนิดนั้น ยังมีการถกเถียงกันอยู่ในกลุ่มนักวิจัย สิ่งที่ค่อนข้างแน่ใจคือ E-cell เป็นเซลล์ต้นแบบที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเพื่อทดแทนเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่ตายไปได้

จึงเป็นเซลล์ที่พบการแบ่งตัวแบบ mitosis ได้มาก คือมี mitotic figure สูง และรวมกันอยู่ในบริเวณปลาย ๆ ของ epithelial tubules (distal part) และ R-cell เป็นเซลล์ที่มีไว้สะสมสารอาหารที่ดูดซึมได้ ดังนั้น จึงมักจะเห็นแวคิวโอล (vacuole) ขนาดเล็กจำนวนมากภายในเซลล์ นักวิชาการทางด้านกึ่งหลายท่านมักจะเรียกให้เข้าใจง่าย ๆ ว่าเม็ดไขมัน แต่ความจริงจะเป็นสารอาหารต่าง ๆ ซึ่งมีทั้งไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และอื่น ๆ อยู่ด้วย ส่วนที่มีการถกเถียงกันอยู่คือหน้าที่ของเซลล์อีกสามชนิดที่เหลือ Hu และ Leung (2007) พบว่า F- และ B-cell เป็นเซลล์ชนิดเดียวกัน แม้ว่าจะมีลักษณะที่ต่างกันทาง histology กล่าวคือ F-cell เป็นเซลล์ที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยอาหารและโปรตีนในเลือดที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งออกซิเจน และภูมิคุ้มกันซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับฮีโมไซยานิน มีลักษณะเป็นเซลล์ที่มี cytoplasm เป็นสี basophilic ทึบไปหมด ขณะที่ B-cell เป็นเซลล์ที่มี vacuole ขนาดใหญ่เพียงหนึ่ง vacuole อยู่ใน cytoplasm ทำหน้าที่สังเคราะห์และหลั่งเอนไซม์ แต่พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดนั้นมี cathepsin L ซึ่งเป็น protease อยู่มาก โดยที่ F-cell มี rough endoplasmic reticulum ใน cytoplasm ที่ทำหน้าที่สร้าง protein และในกรณีนี้คือสร้าง cathepsin L ซึ่งจะสะสมมากขึ้นใน vacuole กลายเป็น B-cell ซึ่งจะหลุดออกจาก epithelial tubule และเข้าไปใน lumen เพื่อให้ cathepsin L ย่อย protein ที่กักเก็บเข้าไป เรียกลักษณะการ “ปล่อย” enzyme หรือ secretory product ออกนอกเซลล์แบบหลุดออกไปทั้งเซลล์นี้ว่า holocrine secretion ส่วนหน้าที่ของ M-cell นั้น ยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากเป็น cell ขนาดเล็กที่คล้ายกับ E-cell แต่อยู่ใกล้มาทาง basement membrane มากกว่า lumen จึงคาดว่าน่าจะทำหน้าที่ด้านการสร้าง vitellogenin หรือ hemocyanin หรือสารอื่น ๆ มากกว่า F- และ M-cell มีลักษณะที่คล้ายกัน คือมี basophilic cytoplasm และไม่มี vacuole แต่ F-cell มีรูปร่างคล้ายกระสวยและอยู่ชิดกับ lumen ขณะที่ M-cell มีรูปร่างกลมหรือสี่เหลี่ยม และอยู่ใกล้ basement membrane (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 จุลกายวิภาค (histology) ของ hepatopancreas ของกุ้ง A) ภาพถ่ายตามแนวยาวของท่อตับ และเซลล์ชนิดต่าง ๆ E, B, F, M และ R-cell ที่ย้อมด้วย periodic acid Schiff (PAS) ร่วมกับ alcian blue staining B) ภาพถ่ายตามแนวขวางของท่อที่ย้อมสีด้วย H&E B-cell มีแวคิวโอลขนาดใหญ่กินพื้นที่ใหญ่ของไซโตพลาสซึม และ R-cell ที่มีรูปร่างแบบปริซึมและไซโตพลาสซึมย้อมติดสี acidophilic C) M-cell เซลล์มีรูปร่างเป็นสามเหลี่ยม ตรงกลางเป็นนิวเคลียสโดยไซโตพลาสซึมย้อมติดสี basophils D) F-cell ไซโตพลาสซึมย้อมติดสี basophils สีเข้มชั้นอยู่บริเวณ basement membrane ยาวไปถึงส่วนของท่อลูเมน E) E-cell มีนิวเคลียสขนาดใหญ่กินพื้นที่ส่วนใหญ่ของไซโตพลาสซึม
ที่มา: Silva et al. (2018)

2. โรคกุ้งและสาเหตุเชื้อก่อโรค

เชื้อโรคที่เกิดในกุ้งทะเลมีหลายชนิด ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิต (ตารางที่ 1) เชื้อโรคบางชนิดส่งผลทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมาก (mass mortality) ในระยะเวลาอันสั้นภายใน 1 สัปดาห์ ได้แก่ โรคตัวแดงดวงขาว (white-spot disease, WSD) โรคหัวเหลือง (yellow-head disease, YHD) โรคตายด่วน (early mortality syndrome, EMS) หรือที่เรียกเป็นทางการว่า acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) โรคบางชนิดทำให้กุ้งโตช้า เช่น โรคติดเชื้อไวรัสแหลมสิงห์ (Laem-Singh virus, LSNV) โรคติดเชื้อราชนิด *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) หรือ microsporidian hepatopancreatitis โรคขี้ขาว (white-feces disease, WFD) โรคติดเชื้อ infectious

hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) โรคติดเชื้อ *Penaeus monodon densovirus* (PmDENV) และโรคติดเชื้อ Monodon baculovirus (MBV) สำหรับโรคติดเชื้อ EHP นั้น นอกจากจะทำให้กุ้งโตช้าแล้วยังทยอยตายอีกด้วย ส่วนโรคติดเชื้อ IHHNV ทำให้กุ้งขาว *L. vannamei* มีลักษณะพิการและโตช้า กุ้งไม่ตาย แต่ทำให้กุ้งทะเลชนิด *L. stylirostris* ตายอย่างเฉียบพลัน แต่โรคนีกลับไม่สร้างปัญหาที่เด่นชัดต่อกุ้งกุลาดำ ดังนั้นผลเสียจากการติดเชื้อโรคของกุ้งทะเลนั้นจึงขึ้นอยู่กับชนิดของกุ้งด้วย ปัญหาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลในประเทศไทยในปัจจุบัน (พ.ศ. 2563) คือการเป็นโรคตัวแดงดวงขาว ตามด้วยการโตช้าที่เกิดจากการติดเชื้อ EHP รวมทั้งการเป็นโรคขี้ขาว ซึ่งอาจจะเกิดจากการติดเชื้อ EHP และมีการติดเชื้อ *Vibrio* spp. อันร่วมด้วย (Tang et al., 2016) นอกจากนี้ในประเทศไทยแล้ว ยังมีรายงานของการติดเชื้อ EHP และสร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในหลายประเทศ เช่น ในประเทศจีน เวียดนาม อินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย

ตารางที่ 1 โรคที่สำคัญและเชื้อก่อโรคในกุ้งทะเลโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เป็นกุ้งเพาะเลี้ยง (farmed shrimp)

เชื้อก่อโรค	ชื่อโรคที่เรียกกันทั่วไป
ไวรัส	
White-spot syndrome virus (WSSV)	โรคตัวแดงดวงขาว (White-spot disease)
Yellow-head virus (YHV)	โรคหัวเหลือง (Yellow-head disease)
Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV)	Runt-deformity syndrome
<i>P. monodon densovirus</i> (PmDENV)	
Monodon baculovirus (MBV)	
แบคทีเรีย	
<i>Vibrio harveyi</i> and <i>Vibrio</i> spp.	โรคตับอักเสบ โรคเรืองแสงในตับ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ชนิดสร้าง พิษทำลายตับ	Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) หรือ early mortality syndrome (EMS)
รา	
<i>Enterocytozoon hepatopanaei</i> (EHP)	อาจเป็นสาเหตุส่วนหนึ่งของโรคขี้ขาว
ปรสิตร	
Gregarine	โรคพยาธิกรีการีน

ที่มา: ดัดแปลงจาก นิรอยฮานนะห์ (2563)

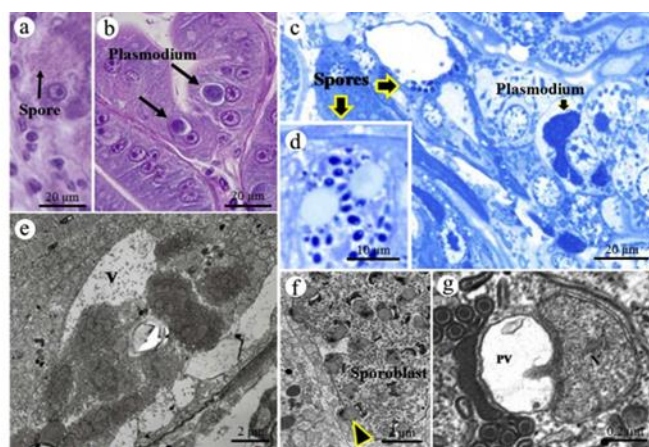
3. เชื้อรา *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)

เชื้อ EHP นี้จัดอยู่ใน Phylum *Microspora*, Class *Microsporea*, Order *Microsporida*, Suborder *Apansporobltina*, Family *Enterocytozoonidae*, Genus *Enterocytozoon* ในระยะแรก มีความสับสนอยู่บ้างในการจัดกลุ่มของ phylum นี้ โดยก่อนหน้านี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มโปรโตซัว (protozoa) เชื้อราในไฟลัม Microsporidia บางชนิดสามารถเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ โดยเฉพาะผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น *Enterocytozoon bienersi* สามารถเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของผู้ป่วยโรคเอดส์ หรือโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (acquired immunodeficiency syndrome : AIDS) *E. bienersi* มีสารพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับเชื้อ *Enterospora canceri* ที่พบในปู เชื้อราในไฟลัมนี้มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ (double stranded DNA: dsDNA) และมี 18s rDNA ที่คล้าย ๆ กัน จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) จึงจัดเชื้อ EHP นี้อยู่ในกลุ่มของเชื้อรา หรือ fungus (Vossbrinck and Debrunner- Vossbrinck, 2005) มีรายงานการติดเชื้อ EHP ครั้งแรกเป็นการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ในประเทศมาเลเซีย ในปี พ.ศ. 2532 (Anderson et al., 1989) และต่อมาในกุ้งครุมา *Marsupenaeus japonicus* ในประเทศออสเตรเลีย ในปี พ.ศ. 2544 (Hudson et al., 2001) สำหรับในประเทศไทยได้พบการติดเชื้อ EHP ครั้งแรกในกุ้งกุลาดำในปี พ.ศ. 2547 (Chayaburakul et al., 2004)

ในปี พ.ศ. 2552-2553 ได้เกิดการระบาดของโรคชี้ขาวในกุ้งขาว *L. vannamei* ในประเทศไทยและในประเทศต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงกุ้งขาว และต่อมาก็พบในกุ้งกุลาดำด้วย ตัวอย่างกุ้งที่เป็นโรคชี้ขาวที่รายงาน พบว่าทุกตัวมีการติดเชื้อ EHP ในปริมาณมาก และยังพบสปอร์ของ EHP ในซีกุ้งที่เป็นสีขาวลอยอยู่บนผิวน้ำอีกด้วย (Tang et al., 2016) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า โรคชี้ขาวเกิดจากการติดเชื้อ EHP และส่วนที่เป็นสีขาวนั้นเป็นสปอร์ของ EHP และชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อและเซลล์ของตับของกุ้งที่ถูก EHP ทำลายและขับออกมาทางลำไส้ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการไม่พบว่าเชื้อ EHP ส่งผลทำให้กุ้งตายหรือเกิดอาการชี้ขาวแต่อย่างใด (Tangprasittipap et al., 2013) ดังนั้น จึงเกิดสมมุติฐานขึ้นมาว่าโรคชี้ขาวอาจจะเกิดจากการที่กุ้งติดเชื้อ EHP และมีการติดเชื้อ *Vibrio* spp. ซ้ำเติม คือมี superimposed bacterial infection และหากไม่มีการติดเชื้อซ้ำเติม กุ้งที่ติดเชื้อ EHP อย่างเดียว อาจจะไม่เป็นโรคชี้ขาว อย่างไรก็ตาม การติดเชื้อ EHP ในกุ้งที่เพาะเลี้ยงนั้นได้สร้างปัญหาให้แก่เกษตรกรอย่างมาก เพราะการโตช้าของกุ้งเป็นการสูญเสียค่าใช้จ่ายโดยไม่มีผลตอบแทนกลับมาอย่างคุ้มค่า เกษตรกรที่ประสบปัญหาโรคชี้ขาวในกุ้งนี้มักต้องจับกุ้งขายก่อนเวลาอันควรเพื่อไม่ให้ขาดทุน

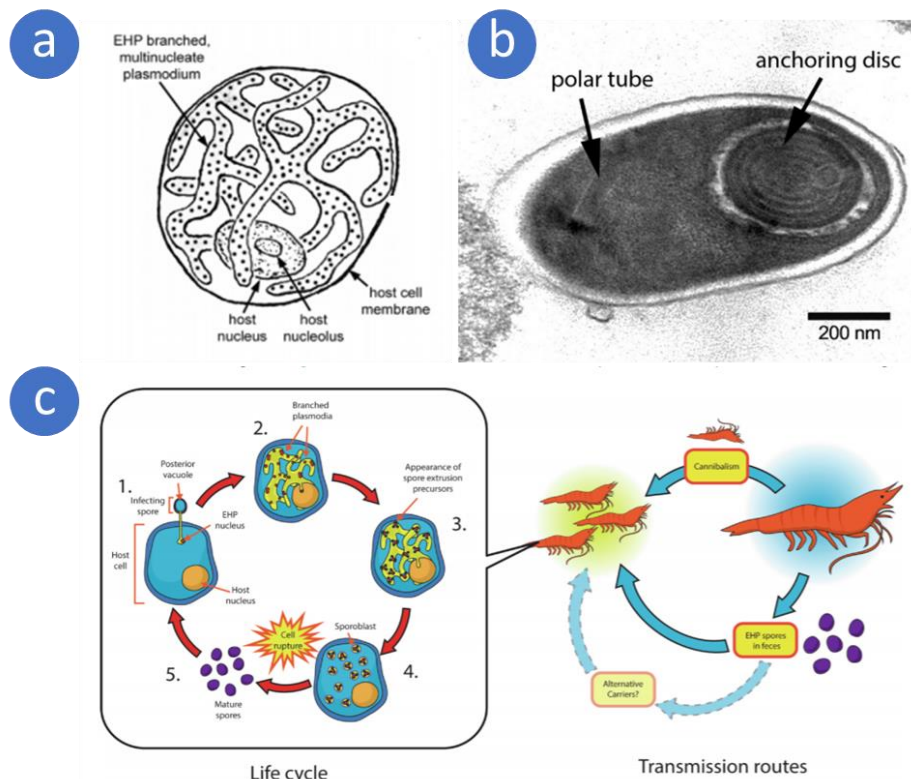
เชื้อรา EHP เป็นเชื้อราที่จำต้องอาศัยอยู่ภายในเซลล์ (obligate intracellular fungi) และมีลักษณะพิเศษคือไม่มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ดังนั้นจึงต้องอาศัยพลังงานที่ผลิตจากไมโทคอนเดรียของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เชื้อราในไฟลัม Microsporidia นี้ก่อให้เกิดโรคในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะสมบูรณ์ (eukaryotic animals) ที่มีและไม่มีกระดูกสันหลัง (Didier, 2004) เมื่อตุลลักษณะทางสัณฐานเนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์ตับที่ติดเชื้อ EHP จะพบว่าเซลล์หลายชนิดของตับมีสปอร์ของ EHP เป็นเม็ดเล็กๆ (granules) ที่มีสีค่อนข้างดำ (acidophilic) และอยู่ใน

ไซโทพลาส (cytoplasm) (ภาพที่ 4) บางเซลล์จะพบ basophilic inclusions ขนาดใหญ่อยู่ภายในไซโทพลาสซึม นั่นคือลักษณะของ EHP ที่พัฒนาการขึ้นมาหลังจากที่ตีเอ็นเอของ EHP ได้เข้าไปอาศัยอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านและเรียกว่า พลาสโมเดียม (plasmodium) ซึ่งมีหลายนิวเคลียส (multi-nuclear plasmodium) ต่อมาพลาสโมเดียมจะค่อย ๆ เปลี่ยนรูปร่างไปโดยที่แต่ละนิวเคลียส (nucleus) มีการเปลี่ยนแปลงไปพร้อมที่จะกลายเป็นสปอร์ เรียกรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ว่า สปอร์โรบลาส (sporoblast) ซึ่งหมายถึงสิ่งที่จะกำเนิดให้สปอร์ กระบวนการสร้างสปอร์นี้เรียกว่า สปอร์โรโกนี (sporogony) หลังจากนั้นสปอร์แต่ละตัวจะแยกออกคือไม่อยู่ร่วมกันในสปอร์โรบลาสอีกต่อไป และในที่สุดสปอร์เหล่านั้นก็จะทำลายเซลล์เจ้าบ้าน และกระจายออกมาเป็นอิสระเพื่อที่จะเข้าสู่เซลล์อื่น ต่อไป หรือหลุดออกมาจากตัวเข้าสู่ lumen ของตัวต่อไปถึงกระเพาะและลำไส้ของกิ้ง และออกมาพร้อมกับขี้กิ้งอยู่ในน้ำและสิ่งแวดล้อมในบ่อกิ้ง หากกิ้งกินสปอร์เหล่านี้เข้าไป สปอร์จะเข้าสู่เซลล์ของตัวของกิ้งตัวใหม่ สปอร์ของเชื้อมีรูปร่างกลมรีขนาด 0.7-1.1 ไมโครเมตร มีผนัง (envelope) หุ้ม ภายในแต่ละสปอร์นั้นมีลักษณะ (structure) ที่เรียกว่า polar tube อยู่ เมื่อสปอร์จะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน polar tube จะถูกยื่นออกไปแทงทะลุผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) แล้วปล่อยสารพันธุกรรม (genetic materials) เข้าไปในไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน หลังจากนั้นจะเจริญเป็นพลาสโมเดียม (plasmodium) เป็นวงจรอย่างนี้ต่อไป (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 ลักษณะเนื้อเยื่อตัวกิ้งที่พบว่ามี การติดเชื้อ EHP (a) histological section ของตัวของกิ้งขาว *L. vannamei* แสดงสปอร์ของ EHP ย้อมสี H&E (b) histological section ของตัวของกิ้งขาวแสดง plasmodium ของ EHP ย้อมสี H&E (c) semi-thin section ของตัวที่แสดงสปอร์และ plasmodium ที่ชัดเจน ย้อมสี toluidine blue (d) semi-thin section ของตัวแสดงสปอร์ที่ขยายใหญ่ขึ้นย้อมด้วยสี toluidine blue (e) ภาพถ่าย transmission electron microscope (TEM) แสดง multi-nucleated plasmodium (f) TEM แสดง sporoblast และสปอร์ที่อยู่ภายใน (g) TEM แสดง immature spores. PV, posterior vacuole; V, vacuole

ที่มา: Tourtip et al. (2009)



ภาพที่ 5 (a) แสดงลักษณะการแตกแขนงของ plasmodium EHP ในไซโทพลาสซึมของเซลล์รอบนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน (b) ภาพถ่ายจากสปอร์ของ EHP จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็น polar tube อยู่เป็นท่อนบาง ๆ (c) ขั้นตอนการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและการแพร่เชื้อของ EHP พัฒนาการทุกขั้นตอนของ EHP จะเกิดภายใน vacuole ของเซลล์เจ้าบ้านเป็นรูปแบบที่เรียกว่า parasitophorous vacuole

ที่มา: Thawatchai et al. (2020)

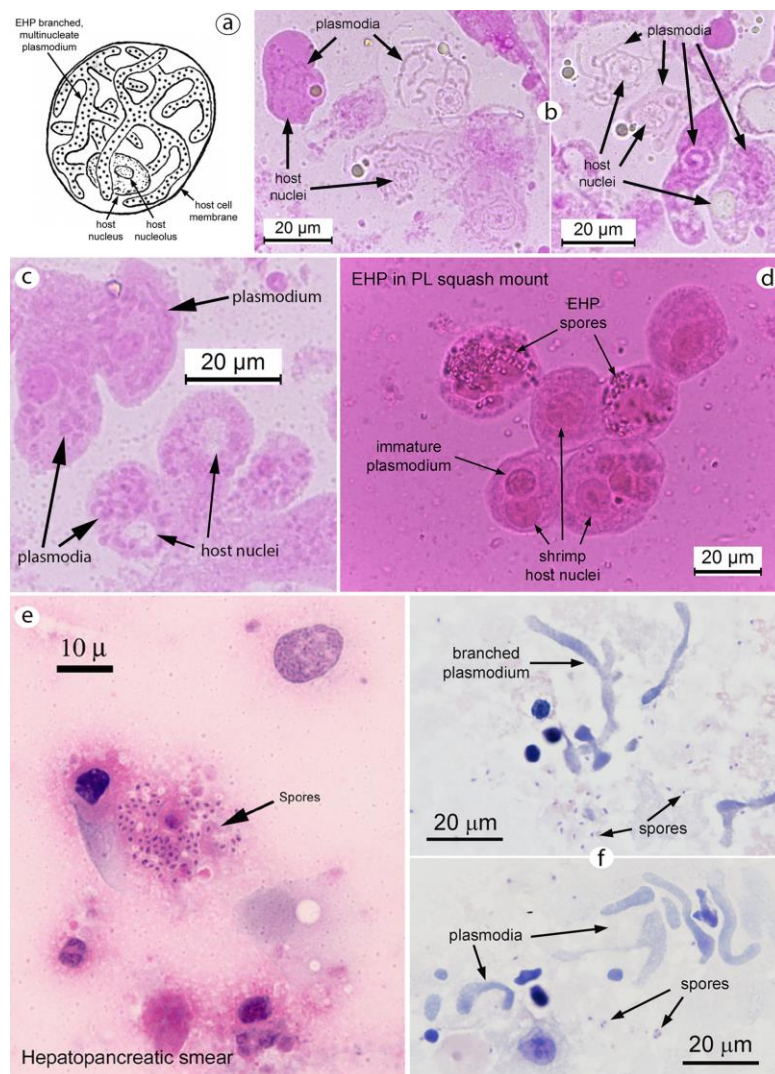
4. การตรวจวินิจฉัย EHP

การตรวจกึ่งที่มีการติดเชื้อ EHP สามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น การตรวจด้วยเนื้อเยื่อวิทยาและการตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

4.1 การตรวจ EHP ด้วยวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา

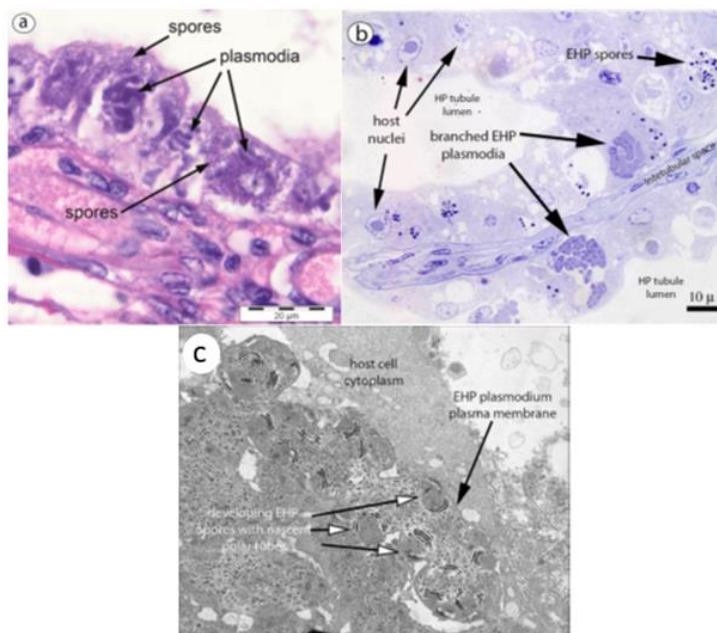
การตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาสามารถตรวจการติดเชื้อ EHP ได้ทุกช่วงชีวิตของสปอร์ที่อยู่ภายในตับกึ่ง การตรวจสปอร์และพลาสมาเดียมจะใช้สีย้อมทำให้สังเกตเห็นเม็ดสปอร์และพลาสมาเดียมล่องลอยอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตาม หากกึ่งมีการติดเชื้อปริมาณน้อยและด้วยสปอร์มีขนาดเล็ก การตรวจด้วยการย้อมสีสปอร์อาจไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อได้ ซึ่ง

เป็นข้อจำกัดของวิธีนี้ อย่างไรก็ตาม การย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อหาเม็ดสปอร์หรือพลาสโมเดียมก็เป็นวิธีที่ง่ายต่อเกษตรกรที่ปฏิบัติอยู่หน้าฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง เกษตรกรสามารถตรวจได้เองเพื่อประเมินการติดเชื้อ EHP ในลูกกุ้ง เรียกกันโดยทั่วไปว่า squash mounts วิธีนี้ใช้ตรวจการติดเชื้อกุ้งในระยะ larvae และ post larvae (PL) สามารถตรวจกุ้งได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน ทำได้ง่ายไม่ยุ่งยากและไม่เสียเวลา โดยนำเนื้อเยื่อต่บกุ้งวางลงบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดสารละลายสีย้อม phloxine B ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หรือสี malechite green หรือ eosin ลงบนตัวอย่างตามด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย หรืออาจใช้เพียงแค่น้ำกลั่นก็ได้ แต่การใช้สีย้อมจะทำให้สังเกตสปอร์ได้ง่ายขึ้น ปิดแผ่นสไลด์แล้วนำสไลด์ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะสังเกตเห็นสปอร์และพลาสโมเดียม (ภาพที่ 6 a-d) แต่หากกุ้งมีขนาดใหญ่ขึ้นอยู่ในระยะ juvenile หรือ adult การทำ squash mounts จะนำเนื้อเยื่อต่บบนแผ่นสไลด์แล้วปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ ทำสไลด์ให้แห้งแล้วย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) สปอร์และพลาสโมเดียมจะติดสีม่วงแดง (ภาพที่ 6 e-f) นอกจากนี้ การตรวจการติดเชื้อสามารถเตรียมเนื้อเยื่อต่บกุ้งตามวิธีทางพยาธิวิทยา (Bell and Lightner, 1988) ด้วยการตรึงเนื้อเยื่อต่บในแผ่นพาราฟิล์มตัดให้เป็นแผ่นบางวางบนสไลด์และย้อมสี H&E นำแผ่นสไลด์ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูโครงสร้างเซลล์ต่บ และตรวจหาตำแหน่งของสปอร์และพลาสโมเดียมภายในเซลล์ต่บ (ภาพที่ 7 a-b) หรืออาจนำเนื้อเยื่อต่บที่ถูกรีดในพาราฟิล์มนี้ ส่องดูโครงสร้างเซลล์ต่บและระยะการพัฒนาของสปอร์และพลาสโมเดียมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (transmission electron microscopy, TEM) (ภาพที่ 7 c) ต่อมาไม่มีการพัฒนาสีย้อมสปอร์ชนิด Chormotrope ทำให้สังเกตเห็นเม็ดสปอร์ด้วยหัวขยาย 40x ได้ง่ายขึ้น แต่จากการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี *in situ* hybridization (ISH) ที่ใช้การตรวจจับสปอร์ด้วยโพรบ DNA (DNA probe) ซึ่งจำเพาะกับดีเอ็นเอของ SSU rRNA (Tangprasittipap et al., 2013; Tang et al., 2015) พบว่าการตรวจการติดเชื้อด้วย ISH มีความไวมากกว่าสามารถประเมินความรุนแรงของการติดเชื้อได้ ตรวจจับ EHP ได้ในทุกระยะของการพัฒนาตั้งแต่ พลาสโมเดียม สปอโรพลาสโมเดียม สปอโรพลาสต์ และสปอร์ และสามารถตรวจพบการติดเชื้อได้แม้จะมีการติดเชื้อในปริมาณน้อย (ภาพที่ 8) อย่างไรก็ตาม ISH มีขั้นตอนยุ่งยากซับซ้อนและเหมาะสำหรับใช้ในงานทดลองเพื่อการวิจัยเท่านั้นยังไม่เหมาะในระบบฟาร์ม ดังนั้น จึงต้องมีการพัฒนาแอนติบอดีที่จำเพาะกับรา EHP เพื่อนำมาพัฒนาการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายต่อเกษตรกรในฟาร์ม

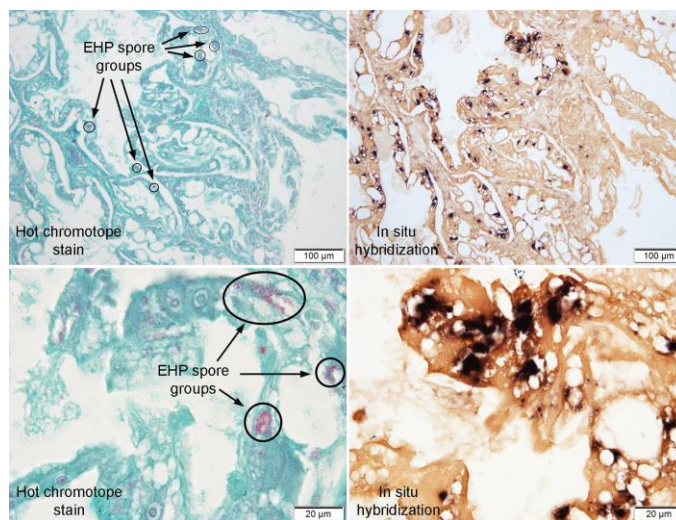


ภาพที่ 6 สปอร์และพลาสโมเดียมของ EHP ในเนื้อเยื่อตับด้วยการทำ squash mount (a) ภาพแสดงลักษณะของพลาสโมเดียมในไซโตพลาสซึมที่อยู่รอบๆนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน (b) ทำ squash mount เซลล์ตับย้อมด้วยสี phloxine B จะย้อมติดสีของพลาสโมเดียมและนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน (c) พลาสโมเดียมที่มีขนาดหนาขึ้น (d) (e) (f) เซลล์ตับบนแผ่นสไลด์แล้วย้อมด้วยสี H&E พบสปอร์เกาะกลุ่มกันและถุงพลาสโมเดียม

ที่มา: Chaijarasphong et al. (2021)



ภาพที่ 7 เนื้อเยื่อตับกึ่งถูกตรึงบนแผ่นพาราฟิล์ม (a) ย้อมด้วยสี H&E (b) ย้อมด้วยสี toluidine blue พบสปอร์ EHP และพลาสโมเดียม (c) ภาพถ่ายจากกล้อง TEM พบการพัฒนาของสปอร์ระยะต่างๆ
ที่มา: Chaijarasphong et al. (2021)



ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ EHP ย้อมด้วยวิธี Chromotrope (ซ้าย) พบเม็ดสปอร์ซึ่งมีการติดเชื่อน้อย เปรียบเทียบกับการตรวจด้วยวิธี ISH (ขวา) พบการติดเชื้อรุนแรง
ที่มา: Chaijarasphong et al. (2021)

4.2 การตรวจ EHP ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

แม้ว่าการตรวจกึ่งที่ติดเชื้อ EHP ด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเป็นวิธีที่รวดเร็วและง่ายแต่เป็นวิธีที่ไม่แนะนำให้ปฏิบัติสำหรับกึ่งระยะ juvenile และระยะอื่นๆ การตรวจการติดเชื้อ EHP ด้วยวิธีชีวโมเลกุลมีรายงานด้วยกันหลายวิธี ซึ่งเป็นการตรวจระดับดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งการใช้วิธีนี้มีความไวสูงและมีความจำเพาะต่อเชื้อโรค รวมถึงมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างง่ายกว่าการเตรียมตัวอย่างทางเนื้อเยื่อวิทยา สามารถสรุปการตรวจเชื้อ EHP ด้วยวิธีต่างๆ ซึ่งแต่ละวิธีมีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความสะดวกในการนำมาใช้งาน (accessibility) และปริมาณที่ตรวจจับ (quantitative) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ EHP ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล

Method	Sensitivity	Specificity	Accessibility	Quantitative
<i>Clinical methods</i>				
light microscopy	D	C	B	C
<i>In situ</i> hybridization	C	B	D	B
<i>Molecular technique</i>				
One-step PCR	B	B (SSU-rRNA)	C	C
Nested PCR	A	A (SWP)	C	B
LAMP	A	B (SSU-rRNA)	A	C
qPCR	A	B (SSU-rRNA)	D	A

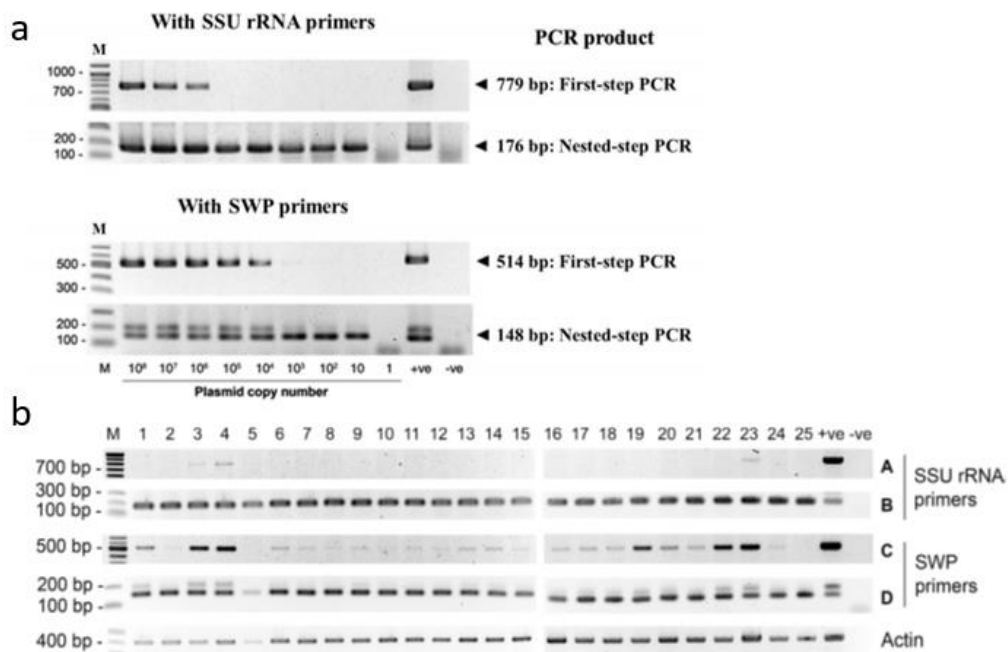
หมายเหตุ ค่าคะแนน A-D : A; Best และ D; Worst

ที่มา: ดัดแปลงจาก Chaijarasphong et al. (2021)

การตรวจกึ่งที่ติดเชื้อด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีมาตรฐานได้รับการยอมรับของ World Organization for Animal Health (OIE, 2019) ซึ่งการตรวจการติดเชื้อ EHP ด้วย PCR มีหลายแบบ เช่น one-step PCR (Tang et al., 2015; Tourtip et al., 2009) nested PCR (Jareonlak et al., 2016; Tangprasittipap et al., 2013) และ multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจการติดเชื้อ EHP และเชื้อโรคกึ่งชนิดอื่นพร้อมกัน (Koiwai et al., 2018) การทำ one-step PCR เป็นวิธีที่ง่ายใช้ไพรเมอร์คู่เดียวในการทำปฏิกิริยา แต่มีข้อจำกัดตรงที่ต้องมีจำนวนดีเอ็นเอ ของเชื้อโรคเริ่มต้นในช่วง 1,000-10,000 copy ต่อปฏิกิริยา และไม่สามารถตรวจการติดเชื้อในระยะที่เป็นพาหะเนื่องจากมีปริมาณเชื้อน้อย ส่วน nested PCR ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ มีความไวมากกว่า one-step PCR เพิ่มขึ้น 10 เท่า สามารถตรวจโรคได้แม้มีเชื้อปริมาณต่ำจะตรวจพบเชื้อที่ 10 copy ต่อปฏิกิริยา (Jareonlak et al., 2016; Tangprasittipap et al., 2013) นอกจากนี้ nested PCR สามารถบอกความรุนแรงของการติดเชื้อได้ หากมีการติดเชื้อรุนแรงผลการตรวจจะพบแบนที่จำเพาะต่อเชื้อในปฏิกิริยาแรกและรอบที่ 2

แต่หากมีการติดเชื้อน้อยจะพบแถบแบนดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในปฏิกิริยารอบที่ 2 เท่านั้น แม้ว่าการตรวจการติดเชื้อด้วยปฏิกิริยา PCR จะมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ แต่อาจให้ผลที่ผิดพลาดได้หากยีนที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์มีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม ยีนบริเวณ SSU-rRNA มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนมากในสปีชีส์เดียวกัน และมีความแตกต่างเพียงพอในการนำมาจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ จึงมักถูกใช้ในการทำ PCR เพื่อใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์และตรวจการติดเชื้อก่อโรค การตรวจการติดเชื้อ EHP ในช่วงแรกจึงใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก SSU-rRNA แต่เมื่อมีการนำลำดับยีนมาเปรียบเทียบความเหมือน (multiple sequence alignment) พบว่าบริเวณ annealing site ที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์มีความเหมือนกันมากเมื่อเปรียบเทียบระหว่างราทะเลกลุ่ม aquatic microsporidian ให้ความเหมือน 68-90% ดังนั้นไพรเมอร์ SSU-rRNA ที่ใช้ตรวจการติดเชื้อ EHP สามารถจับกับดีเอ็นเอของราทะเล aquatic microsporidian ที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น *Enterospora canceri* (Stentiford et al., 2007) และ *Hepatospora eriocheir* (Jaroenlak et al., 2016; Stentiford et al., 2011) ทำให้ SSU-rRNA ไม่เหมาะในการทำมาตรวจเชื้อ EHP ในซีกุ้ง อาหารน้ำในบ่อเลี้ยง ซึ่งอาจมีรากลุ่ม microsporidian ปนเปื้อนอยู่ ต่อมามีการออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่จำเพาะกับ spore wall protein (EhSWP1) ซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะต่อเชื้อ EHP และ ปฏิกิริยา nested PCR (SWP-PCR) สามารถแยกความแตกต่างของรากลุ่ม microsporidian ที่มีความใกล้เคียงกันออกจากกันได้ และปฏิกิริยามีความไวที่ 10 copy ต่อปฏิกิริยา ไพรเมอร์มีความไวสูงเมื่อนำมาตรวจการติดเชื้อของกุ้งในฟาร์มเลี้ยง การตรวจ EHP ด้วย SWP-PCR จึงสามารถประเมินระดับความรุนแรงของการติดเชื้อได้ (ภาพที่ 9)

การวัดปริมาณเชื้อ EHP (EHP quantitative) ด้วยเทคนิค real-time PCR (qPCR) สามารถใช้ประเมินความรุนแรงและการแพร่ระบาดของ การติดเชื้อ การตรวจด้วย qPCR จะใช้สี SYBR-Green I fluorescence และ TaqMan probe ซึ่งสามารถตรวจจับเชื้อได้ 83 และ 40 copy ตามลำดับ และพบความสัมพันธ์แบบแปรผกผันของปริมาณเชื้อที่ลดลงเมื่อมีน้ำหนักตัวกุ้งเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การตรวจการติดเชื้อด้วย qPCR มีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากเครื่องมือ สารเคมี และน้ำยาที่ใช้วิเคราะห์มีราคาแพง และถึงต้องการการดูแลและการเก็บรักษาที่ดี รวมถึงผู้ปฏิบัติงานต้องมีความรู้และความเชี่ยวชาญด้านชีวโมเลกุล ทำให้การตรวจการติดเชื้อ EHP ด้วย qPCR จึงใช้เฉพาะการวิจัยในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 9 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ของการตรวจเชื้อ EHP ด้วยวิธี nested PCR (a) ความไวของไพรเมอร์ SSU และ SWP ในการตรวจเชื้อ EHP และ (b) การตรวจการติดเชื้อ EHP ในตัวอย่างกึ่งจากฟาร์มเลี้ยงด้วยวิธี nested PCR เปรียบเทียบระหว่างไพรเมอร์ SSU และ SWP โดยใช้ไพรเมอร์ housekeeping gene actin เป็น internal control. M, markers; +ve, positive control; -ve, negative control

ที่มา: Jaroenlak et al. (2016)

5. ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง (shrimp immune system)

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยที่กุ้งไม่สามารถจดจำความแตกต่างของสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพต่างๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง (adaptive immunity) และการตอบสนองเมื่อติดเชื้อครั้งถัดมาจะเกิดขึ้นในลักษณะเดิม การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอาศัยการตอบสนองของเซลล์และการตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำ เมื่อเกิดการติดเชื้อ ระบบภูมิคุ้มกันจะใช้ตัวรับในกลุ่ม pattern recognition receptors (PRRs) จับกับโมเลกุลของเชื้อโรคในกลุ่ม pathogen associated molecular pattern (PAMPs) ทำให้เกิดการสื่อสารภายในเซลล์เม็ดเลือดกุ้ง เกิดการสร้างสารที่ไปยับยั้งเชื้อโรค และกระตุ้นการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมต่อไป เซลล์เม็ดเลือดกุ้ง เรียกว่า hemocytes นอกจากนี้จะทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนแล้ว ยังทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย โดยกุ้งมีกลไกการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคโดยมีเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

5.1 กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defense mechanism)

กุ้งมีโครงสร้างแข็งภายนอก (exoskeleton structure) ซึ่งเป็นสารพวก chitin และ chitosan โดยบริเวณเนื้อเยื่อภายใต้โครงสร้างปกคลุมที่เรียกว่าเปลือก จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือก (mucopolysaccharide หรือ mucous) และหลั่งสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibitor) ที่สร้างจากเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ในขณะที่กุ้งลอกคราบ (molting) เพื่อการเจริญเติบโตกุ้งสามารถกำจัดปรสิตบริเวณผิวตัวออกไปพร้อมกับเปลือกแข็งได้ด้วย

5.2 กลไกการป้องกันตนเองภายในร่างกาย (internal defense mechanism)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคเข้าสู่ร่างกายกุ้งได้ กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ

5.2.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยเซลล์ (cellular immune response)

อาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดที่มีบทบาทสำคัญได้แก่เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) 3 ชนิด คือ 1) ไฮยาไลน์เซลล์ (hyaline cells) มีหน้าที่หลักช่วยในการแข็งตัวของเลือด และการเก็บกินสิ่งแปลกปลอม 2) แกรนูโลไซต์ (granulocytes) มีหน้าที่หลักในการเก็บกินสิ่งแปลกปลอม การล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมเพื่อทำลาย (encapsulation) กระบวนการการทำลายเชื้อโรคผ่านเอนไซม์ที่เรียกว่า prophenoloxidase (ProPO) cascade 3) เซมิแกรนูโลไซต์ (semi-granulocytes) มีหน้าที่หลักในการล้อมรอบสิ่งแปลกปลอมเพื่อทำลาย การเก็บกินสิ่งแปลกปลอม และการแข็งตัวของเลือด ซึ่งจะกระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อ ภายในกระแสเลือดต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) กล้ามเนื้อหัวใจ hepatopancreas และอวัยวะอื่น ๆ และภายในน้ำเลือดกุ้งมีองค์ประกอบของฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่หลากหลาย เช่น ขนส่งออกซิเจน ขนส่งฮอร์โมนลอกคราบ ecdysone และเป็นสารตั้งต้นของสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา การทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันกุ้งประกอบด้วย การเก็บกินสิ่งแปลกปลอม

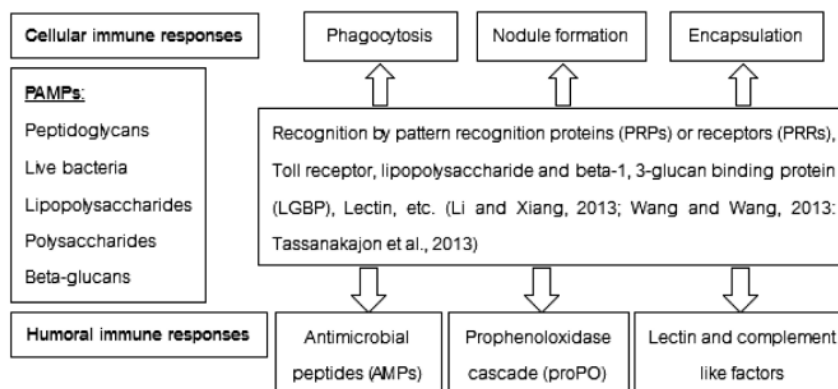
(phagocytosis) การตายของเซลล์ที่ติดเชื้อ (apoptosis) การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) และการสร้างก้อน (nodule formation)

5.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีการตอบสนองโดยการหลั่งสารน้ำ (humoral immune response)

เป็นการทำงานของโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในน้ำเลือด เช่น แอคกลูตินิน (agglutinin)

สารคล้ายไซโตไคน์และคอมพลีเมนต์ (cytokine and complement like factors) โมดูเลเตอร์ (modulators) สารที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting proteins) สารน้ำที่เป็นผลิตภัณฑ์จากระบบโปรฟีนอลออกซิเดสที่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือด และสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide, AMPs) ระบบภูมิคุ้มกันทั้งสองระบบจะมีการทำงานร่วมกัน เพื่อทำหน้าที่ป้องกันและทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ตัวกึ่ง การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันใช้หลักการเลียนแบบการติดเชื้อของกึ่ง หรือการให้สิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกายกึ่ง แต่เชื้อที่ใช้จะไม่สามารถก่อโรคในกึ่งได้ เช่น การใช้เชื้อตาย เชื้ออ่อนกำลังลง หรือเชื้อที่ไม่ก่อโรค เป็นต้น ซึ่งคล้ายๆ กับการใช้วัคซีนในมนุษย์ (Smith et al., 2003) จากนั้นกึ่งจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดย การเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือด โปรตีน หรือเอนไซม์ต่างๆ ในขณะนั้นๆ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Soderhall and Cerenius, 1992) เนื่องจากกึ่งมีกระบวนการป้องกันตัวเอง โดยระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดอยู่แล้ว ดังนั้นเป้าหมายของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันก็เพื่อกระตุ้น หรือเพิ่มระดับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ทั้งแบบเซลล์และแบบสารน้ำซึ่งการกระตุ้นจะเกิดในช่วงระยะเวลาหนึ่ง นำไปสู่การเพิ่มการป้องกันโรคและลดปัจจัยที่มีผลต่อการกดภูมิคุ้มกันของกึ่งในระหว่างการเลี้ยง (Sakai, 1999)

จากภาพที่ 10 สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ จะเกิดกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกึ่ง โดยเริ่มจากปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง PAMPs ผ่านตัวรับ Pattern recognition proteins (PRPs) หรือ Pattern recognition receptors (PRRs) จากนั้นโมเลกุลหรือโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signal molecules) จะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในระบบเลือดจะเคลื่อนที่เข้ามาในบริเวณที่มีการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม ต่อมาจะเกิดการทำงานร่วมกันของระบบภูมิคุ้มกันโดยเซลล์เม็ดเลือด ได้แก่ ขบวนการฟาโกไซโทซิส ขบวนการโนคูเลชัน ขบวนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดใหญ่ และการทำงานของสารที่อยู่ในน้ำเลือด ได้แก่ สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ การทำงานของเอนไซม์ในระบบโปรฟีนอลออกซิเดส และ สารน้ำต่างๆ (Wang and Wang, 2013) ดังนั้นเมื่อมีการใช้สารกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง กึ่งจะมีการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นกัน เป็นการเตรียมความพร้อมในการรับมือกับเชื้อก่อโรคที่จะบุกรุกเข้ามาในระหว่างการเลี้ยง



ภาพที่ 10 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเมื่อมีสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน
ที่มา: มลฤดี (2559)

6. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล (อ้างจาก มลฤดี, 2559)

จากที่กล่าวมากุ้งทะเลจัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีเพียงระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันภายหลังจึงไม่สามารถจดจำเชื้อก่อโรค ทำให้ไม่สามารถผลิตวัคซีนสำหรับการป้องกันโรคได้ การควบคุมป้องกันโรคด้วยระบบภูมิคุ้มกัน จึงเน้นการสร้างเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยกำเนิดด้วยการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) คือ สารประกอบใดๆ ก็ตาม ที่มีผลต่อกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ (Anderson, 1992) วัตถุประสงค์ในการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งคือส่งเสริมประสิทธิภาพการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน รักษาระดับ และเพิ่มระยะเวลาการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งลดภาวะของการกดภูมิคุ้มกันที่มีสาเหตุจากความเครียดในระหว่างการเลี้ยง (Barman et al., 2013) การที่สัตว์น้ำมีความแข็งแรงและมีภูมิคุ้มกันโรคสูง จะช่วยลดความเสี่ยงของการสูญเสียอันเนื่องมาจากโรคระบาดในช่วงเวลา หรือฤดูกาลนั้นๆ ได้ รวมทั้งลดการระบาดของโรคประจำถิ่น และเชื้อก่อโรคที่แฝงในตัวกุ้งได้ (Smith et al., 2003) มีงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศที่รายงานถึงความสำเร็จของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งเพื่อควบคุมโรค ซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากสารประกอบจากสิ่งมีชีวิต (biological substances) โดยสามารถจัดแบ่งกลุ่มของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ดังนี้

6.1 สารประกอบหรืออนุพันธ์ที่ได้จากแบคทีเรีย (bacteria derivatives)

นักวิจัยได้มีการนำเซลล์แบคทีเรียและสารประกอบจากแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคในกุ้ง เซลล์แบคทีเรียและสารประกอบหรืออนุพันธ์จากแบคทีเรีย สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ PRRs หรือ PRPs ที่มีชื่อว่า lipopolysaccharide binding proteins (LGBPs) และ peptidoglycan recognition protein (PGRPs) อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกุ้ง (Tassanakajon et

al., 2013) ปัจจุบันมีการเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลากหลายรูปแบบ เช่น แบคทีเรียที่มีชีวิต (live bacteria) ในกลุ่มโปรไบโอติก แบคทีเรีย (bacterin) ซึ่งผลิตมาจากเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตแต่ทำให้อ่อนกำลังลง (attenuated bacterin) และ สารสกัดที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ที่มีส่วนประกอบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) และ เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan, PG) เป็นต้น

6.2 สารประกอบหรืออนุพันธ์ที่ได้จากยีสต์ (yeast derivatives)

จากการค้นพบโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ (PRRs หรือ PRPs) ที่มีชื่อว่า β -glucan binding proteins (β GBPs) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือดกึ่ง (Soderhall and Cerenius, 1992) จึงมีการทดลองใช้ยีสต์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากขึ้น นักวิทยาศาสตร์ทั้งในและต่างประเทศประสบผลสำเร็จในการใช้เบต้ากลูแคนบริสุทธิ์ที่สกัดจากผนังเซลล์ยีสต์ และการใช้ยีสต์ทั้งเซลล์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น กุ้งขาวที่ได้รับเบต้ากลูแคนสกัดจากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผสมอาหารมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสและความสามารถในการต้านทานเชื้อ *V. harveyi* และไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) เพิ่มขึ้น (Bai et al., 2014) นอกจากนี้กุ้งกุลาดำที่ได้รับเซลล์ยีสต์ *Candida aquatextoris* S527 ผสมอาหาร พบว่ามีการแสดงออกของสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพเพิ่มขึ้น (Babu et al., 2013)

6.3 สารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ (nutritional factors)

สารเสริมอาหารที่มีส่วนช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และมีรายงานการใช้ในกุ้ง ได้แก่ วิตามินซี วิตามินอี แอสตาแซนทิน (astaxanthin) เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อสัตว์น้ำเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีรายงานการใช้วิตามินซี (Lee and Shiao, 2002) และวิตามินอี (Lee and Shiao, 2004) ในกุ้ง โดยมีผลต่อการทำงานของอินเตอร์เฟอรอน (interferon) ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase activity, SOD) ในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ (Qiao et al., 2011) ส่วนแอสตาแซนทินเป็นสารสีชนิดหนึ่งในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid pigments) ทำหน้าที่ป้องกันเนื้อเยื่อในร่างกายสัตว์ไม่ให้ถูกทำลายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากหน้าที่ดังกล่าวจึงมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำด้วย กุ้งกุลาดำที่ได้รับแอสตาแซนทินจากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* (นนทวิทย์ และคณะ, 2549) และ *Dunaliella* sp. (Supamattaya et al., 2005) โดยผสมอาหาร มีผลทำให้กุ้งมีอัตราการรอด และความต้านทานต่อเชื้อเพิ่มขึ้น

6.4 สารสกัดจากสัตว์ (animal extracts)

สารสกัดจากสัตว์ เช่น โคติน โคโตซาน โคตินเป็นสารประกอบจำพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) โดยพบมากในสิ่งมีชีวิตที่มีเปลือกหรือผนังแข็งหุ้มลำตัว เช่น กุ้ง ปู หอย แมลง ได้มีรายงานถึงความสำเร็จในการใช้สารประกอบโพลีแซคคาไรด์หรือคาร์โบไฮเดรตเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยจะเข้าจับกับโมเลกุลของโปรตีนตัวรับ ที่มีชื่อว่า lectin receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเม็ดเลือด กุ้ง (Tassanakajon et al., 2013) ผลของการใช้โคตินและโคโตซานในกุ้งกุลาดำ พบว่าสามารถเพิ่มการ

เจริญเติบโต (Niu et al., 2013) และเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในกุ้งขาวได้ (Wang and Chen, 2005)

6.5 สารสกัดจากพืช (plant extracts)

สารสกัดจากพืชสมุนไพร (herbal extracts) สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากมีสารสำคัญหรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ไกลซีร์ไรซิน (glycyrrhizin) ลิกวีริติน (liquiritin) และ กลาบรีดิน (glabridin) รวมทั้งสารออกฤทธิ์อื่นๆ เช่น แอนทราควิโนน (anthraquinone) ซาโปนิน (saponin) อะซาไดแรคติน (azadirachtin) เป็นต้น (ชนกันต์, 2556; Hai, 2015) กุ้งกุลาดำที่กินอาหารผสมสารสกัดกลุ่มโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน (*Durio zibethinus*) (Pholdaeng and Pongsamart, 2010) และสาร polyvinylpyrrolidone ที่สกัดได้จากพญาฮอ (*Clinacanthus nutans*) (Direkbusarakom et al., 1996) มีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ ฟีนอลออกซิเดส และความต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสเพิ่มขึ้น กุ้งขาวที่ได้รับสารกลุ่ม phenolic alkanon ที่สกัดได้จากขิง (*Zingerone officinale*) (Chang et al., 2012) สารซาโปนินที่สกัดจากยัคคา (*Yacca scidigera*) (Yang et al., 2015) และสารสกัดจากว่านทองใบม่วง (*Gynura bicolor*) (Wu et al., 2015) โดยการผสมอาหารให้กินมีปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น

6.6 สารสกัดจากสาหร่าย (seaweed extracts) สาหร่ายประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น n-3 และ n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) โพลีแซคคาไรด์ แร่ธาตุ วิตามิน และสารประกอบโพลีฟีนอล (Burtin, 2003) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น fucoidan, sodium alginate, sulfated galactan, laminarin และ carragenan จากงานวิจัยในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ได้รับ fucoidan ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส การผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น (Immanuel et al., 2012; Kitikiew et al., 2013) รวมทั้งกุ้งขาววัยอ่อนที่ได้รับสาร sulfated galactans ที่สกัดจากสาหร่ายสีแดง *Gracilaria fisheri* ผ่านอาร์ทีเมีย มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส การผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และกิจกรรมการต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเพิ่มขึ้น (Wongprasert et al., 2014)

จากคุณสมบัติของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมีระยะเวลาของการกระตุ้นจำกัด หรือค่อนข้างสั้น ซึ่งต้องมีการกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง (Hai, 2015) การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงปริมาณ รูปแบบที่ใช้ และระยะเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดประสิทธิผลมากที่สุด ซึ่งได้มีการรวบรวมตัวอย่างงานวิจัยที่มีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ ในกุ้ง โดยมีวิธีการใช้ ปริมาณ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล

Immunostimulants	Marine shrimps	Administration/Dose/ Duration	Results (Increased parameters)
Lipopolysaccharide	<i>P. monodon</i> (2-4 g)	Diet/ 4µg/g of shrimp/meal /10 d	Antimicrobial peptide
Bacterin from <i>Bacillus</i> S11	<i>P. monodon</i> (10-12 g)	Diet/ 3%biomass/days/7 d	Phagocytosis activity, *proPO, antibacterial activity
β -glucan	<i>L. vannamei</i> (1-2 g)	Diet/0.1, 0.2%/kg/35 d	Antimicrobial peptide
Chitin, Chitosan	<i>L. vannamei</i> (10-12 g)	Inject/ chitin 6 µg/g, chitosan 4 µg/g/7 d	*THC, SOD, RB, phagocytosis activity
Vitamin C	<i>P. monodon</i> (1-2 g)	Diet/ 2000, 10,000 mg/kg /8 wk.	THC, O ₂ ⁻ , proPO, phagocytosis
<i>Sargassum hemiphyllum</i>	<i>P. vannamei</i> (1-2 g)	Immersion (300 mg/L)	Phagocytosis activity
<i>Gracilaria fisheri</i>	<i>P. monodon</i> (10-15 g)	Inject/ 1 mg/ml of ethanol/ 3, 7, and 14 d	THC, proPO, SOD
Sulfated galactins	<i>P. monodon</i> (5-8 g)	Enriched Artemia/ 200µg/ml/7 d	THC, SOD, O ₂ ⁻ , proPO
<i>Gynura bicolor</i>	<i>L. vannamei</i> (1-2 g)	Diet/ 1, 2%/kg/ 7-28 d	THC, proPO, SOD, RB
Zingerone	<i>L. vannamei</i> (1-2 g)	Diet/ 2.5 and 5 mg/kg/ 56 d	THC, SOD

* THC= Total haemocyte count, proPO= Prophenoloxidase activity, SOD= Superoxide dismutase activity, RB= Respiratory burst activity, O₂⁻= Superoxide anion, ROS= Reactive oxygen species

ที่มา: ดัดแปลงจาก มลฤดี (2559)

7. กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (5-aminolevulinic acid)

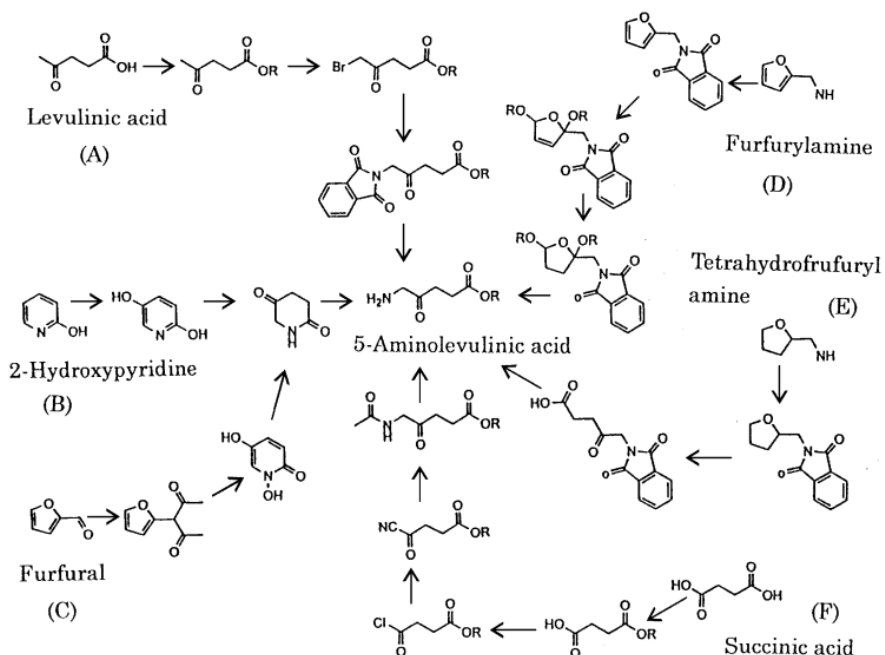
5-อะมิโนลิวูลินิก (5-ALA) เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ได้เป็นองค์ประกอบของโปรตีน (non-protein amino acid) เป็นกรดอะมิโนคาร์บอน 5 อะตอม สารชีวภาพนี้ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ พบมีการสร้างในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น *Rhodospseudomonas palustris* (Saikour et al., 2009) และ *Rhodobacter sphaeroides* (Liu et al., 2016) สาหร่าย เช่น *Scenedesmus obliquus* (Klein et al., 1980) และ *Chlorella* sp. (Sasaki et al., 1995) แบคทีเรีย เช่น *Propionibacterium acidipropionici* (Kiatpapan et al., 2011) และ *Escherichia coli* (Zhang et al., 2015) เป็นต้น 5-ALA เป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่สำคัญสำหรับการสังเคราะห์สารกลุ่มเตตราไพโรล (tetrapyrrole) ได้แก่ ฮีม (heme) พอร์ไฟริน (porphyrin) คลอโรฟิลล์ และวิตามินบี 12 ซึ่งเตตราไพโรลมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเผาผลาญ และการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้น 5-ALA จึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในด้านการแพทย์ การเกษตร และปศุสัตว์ (Sakai et al., 2000, Kang et al., 2012) เช่น ใช้ในตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งและโรคผิวหนัง (Inoue, 2017) ด้านการเกษตร 5-ALA ถูกใช้เป็นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดแมลง สารกระตุ้นการเติบโตพืช มีรายงานว่า 5-ALA สามารถเร่งการสะสมคลอโรฟิลล์ในพืช ส่งผลให้เพิ่มการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิต รวมถึงส่งเสริมให้พืชทนทานต่อสภาพเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่รุนแรง (Wu et al., 2019) ส่วนในด้านปศุสัตว์ 5-ALA ใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ สามารถเพิ่มปริมาณฮีโมโกลบิน ธาตุเหล็ก เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และฮีมาโตครินให้สูงขึ้น เพิ่มการสร้าง ATP และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน จึงช่วยส่งเสริมด้านการเจริญเติบโตของ ไก่ สุกร และสัตว์น้ำ เช่น ปลาซวายและกุ้งขาว (Chen et al., 2008, Wang et al., 2011, Sato et al., 2012, Penrosa-Gerasmino et al., 2019, วิรุฬห์ศักดิ์ และคณะ 2020) ดังนั้น 5-ALA จึงเป็นสารชีวภาพกระตุ้นการเติบโตอีกชนิดหนึ่งที่มีความนิยมนำมาในการผลิตพืช และใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์สำหรับพ่อแม่พันธุ์ มีการคาดการณ์มูลค่าของขนาดตลาดโลกของ 5-ALA ว่าจะมีแนวโน้มสูงถึง 110 ล้านดอลลาร์สหรัฐภายในปี 2567 จากเดิมที่มีมูลค่า 86 ล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2562 (Jiuzhou et al., 2020)

7.1 กระบวนการสังเคราะห์ 5-ALA

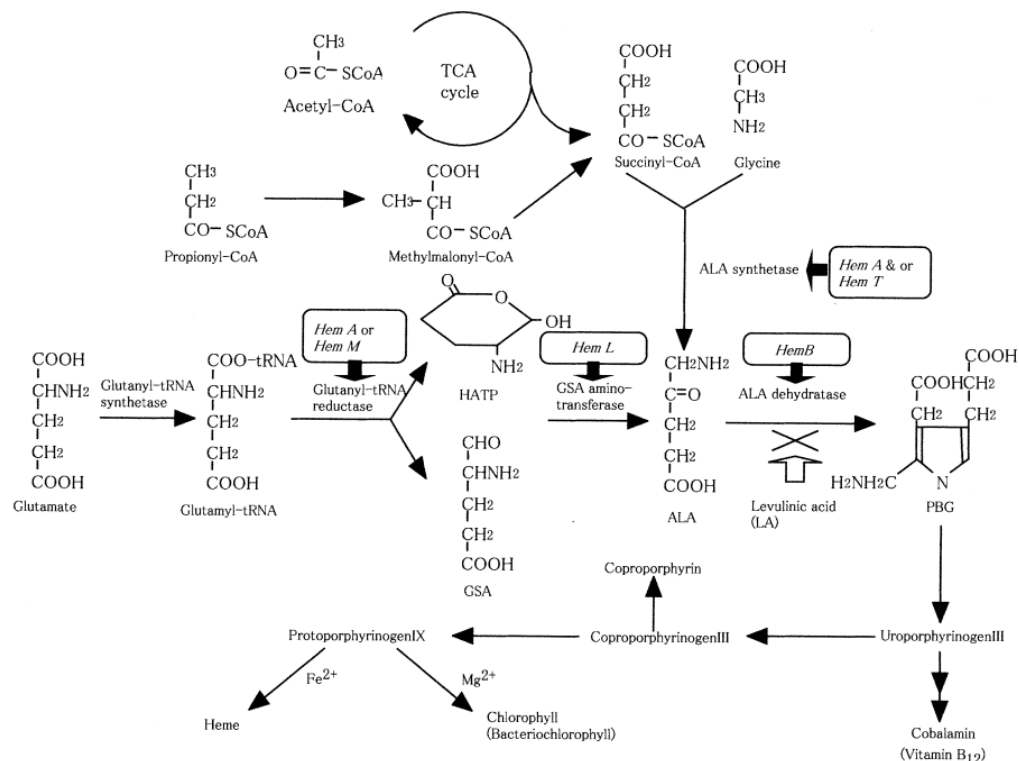
กระบวนการสังเคราะห์ 5-ALA มี 2 กระบวนการคือ การสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biological synthesis) การสังเคราะห์ทางเคมีเป็นวิธีการหลักในการผลิตทางอุตสาหกรรม กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีแบ่งออกเป็น 6 วิธี โดยใช้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์เริ่มจาก (A) levulinic acid, (B) 2-hydroxypyridine, (C) furfural, (D) furfurylamine, (E) tetrahydrofurfurylamine และ (F) succinic acid (ภาพที่ 11) การสังเคราะห์ทางเคมีมีความซับซ้อนยุ่งยาก ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ผลผลิตได้น้อยและมีต้นทุนการผลิตสูง ส่งผลให้ 5-ALA มีราคาแพง ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการนำมาใช้ในทางการเกษตร

การสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biological synthesis) มีกระบวนการผลิตง่าย และใช้ต้นทุนต่ำกว่าการสังเคราะห์ทางเคมี ทำให้วิธีการนี้มีความน่าสนใจเพิ่มขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน แบ่งการ

สังเคราะห์ทางชีวภาพออกเป็น 2 วิธี (pathway) คือ 1) Shemin pathway หรือ C₄ pathway และ 2) C₅ pathway โดยเริ่มการสังเคราะห์สารด้วย C₄ pathway โดยใช้สารตั้งต้น succinyl CoA และ glycine ซึ่ง succinyl CoA ได้จากวัฏจักรเครป (TCA cycle) ในแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิต succinyl CoA จากสารตั้งต้น propionyl-CoA ที่เกิดจากวิถี methymalonyl-CoA pathway (Sasaki, 1990) กระบวนการ C₄ pathway มีเอนไซม์ ALA synthase (ALAS) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญเนื่องจากเป็น rate-limiting enzyme ที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ 5-ALA และสารกลุ่ม tetrapyrrole (ภาพที่ 12) ส่วนการสังเคราะห์ 5-ALA ผ่าน C₅ pathway ใช้สารตั้งต้นเป็น glutamate ซึ่งจะพบวิธีนี้ในสาหร่ายและแบคทีเรียบางชนิด เช่น แบคทีเรียสีม่วง (purple bacteria) และแบคทีเรียสีเขียวที่ต้องการซัลเฟอร์ ในขณะที่การสร้าง ALA ด้วยวิถี Shemin pathway จะเกิดขึ้นในกลุ่มแบคทีเรียสังเคราะห์แสง (photosynthetic bacteria) มีงานวิจัยพบว่าเมื่อเติม levulinic acid (LA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของสาหร่ายหรือแบคทีเรียที่เลี้ยงในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง 5-ALA และหลังสารออกภายนอกเซลล์ (Sasikala and Ramana 1995) อย่างไรก็ตามการเติม LA มากเกินไปจะมีผลในการยับยั้งการสร้าง 5-ALA และฮีม ซึ่งฮีมเป็นสารสำคัญในองค์ประกอบของไซโตโครม (cytochrome compound) ทั้งนี้เพราะ LA มีฤทธิ์ไปยับยั้งเอนไซม์ ALA dehydratase (ALAD)



ภาพที่ 11 การสังเคราะห์ 5-ALA ด้วยกระบวนการทางเคมี
ที่มา: Sasaki et al. (2002)



ภาพที่ 12 กระบวนการทางชีวภาพในการสังเคราะห์ 5-ALA และสารกลุ่ม tetrapyrrole ได้แก่ porphyrin วิตามิน B12 และคลอโรฟิลล์ GSA; glutamate-1-semialdehyde, HAPT; hydroxyl-aminotetraphydro pyranone, PBG; porphobilinogen
ที่มา: Sasaki et al. (2002)

7.2 บทบาทของ 5-ALA ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

มีรายงานการใช้ 5-ALA ในไก่และสุกร พบว่าการเสริมอาหารด้วย ALA สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและเพิ่มภูมิคุ้มกันได้ (Sato 2012; Chen et al., 2008) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีรายงานถึงผลการกระตุ้นของ 5-ALA ต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ปลาสวาย (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*) และกุ้งขาวแวนนาไม โดยการเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่เสริม 5-ALA ที่ได้จากเซลล์แบคทีเรีย *R. sphaeroides* ที่สร้าง 5-ALA ไว้ภายในเซลล์ สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (อมรรัตน์, 2549) เช่นเดียวกับปลาสวาย ที่เสริมอาหารด้วย ALA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็น

เนื้อดีที่สุด รวมถึงกุ้งมีปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ฮีโมโกลบินรวมและฮีมาโตคริตเพิ่มขึ้น รวมถึงเม็ดเลือดขาวมีกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุด (วิรุพท์ศักดิ์ และคณะ 2020) ในกุ้งขาวแวนาไมที่มีการเสริมอาหารด้วย 5-ALA ที่ความเข้มข้น 15 ppm นาน 2 สัปดาห์ กุ้งมีการสะสม ATP ในตับเพิ่มขึ้น และมีระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน และยีนในกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อทำให้กุ้งติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่ากุ้งมีอัตราการตายลดลง เนื่องจากกุ้งมีการแสดงออกของยีนในการป้องกันเชื้อก่อโรคสูงขึ้น ได้แก่ porphobilinogen synthase, ferrochelatase, catalase, nuclear receptor E75 และ heme oxygenase-1 (Pedrosa-Gerasmio et al., 2018) และจากการศึกษาระดับความเข้มข้นของ 5-ALA (15 30 และ 60 ppm) ที่เสริมในอาหารกุ้ง พบว่ากุ้งมีการสะสม ATP ในตับเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ 5-ALA รวมถึงสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ ได้แก่ nuclear receptor E75, cytochrome P450 Shade และ chitinase เมื่อนำกุ้งแช่แบคทีเรียก่อโรค *V. parahaemolyticus* นาน 6 ชั่วโมง พบว่ากุ้งที่เสริม 5-ALA ที่ 60 ppm มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดรวม และมีระดับการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ได้แก่ catalase และ prophenoloxidase จึงทำให้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชุดควบคุม (Pedrosa-Gerasmio et al., 2019) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Direkbusarakom et al. (2021) ที่เสริมอาหารกุ้งด้วย 5-ALA ที่ 15 และ 30 ppm สามารถส่งเสริมการเติบโตของกุ้งขาวแวนาไม และกระตุ้นการแสดงออกของยีน anti-lipopolysaccharide factor, crustin, และ penaeidin 3 ทำให้กุ้งต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค *V. parahaemolyticus* จึงสามารถลดอัตราการตายของกุ้งได้ นอกจากนี้ การเสริมอาหารกุ้งที่ผสม 5-ALA ที่ความเข้มข้น 15 ppm สามารถเพิ่มกลุ่มประชากรแบคทีเรีย (microbiota) ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวได้ (Pedrosa-Gerasmio et al., 2020)

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาความเข้มข้นของ 5-ALA ที่เหมาะสมต่ออัตราการเติบโต และอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ EHP
2. ศึกษาผลของ 5-ALA ต่อการสร้าง ATP ในตับกุ้งที่ติดเชื้อ EHP และพยาธิสภาพของเซลล์ตับกุ้ง

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 วิธีดำเนินการ

2.1.1 การเลี้ยงและการเก็บตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไม

การทดลองครั้งนี้เลี้ยงลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อ EHP จากธรรมชาติ ณ ฟาร์มวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Aqua Academy Farm, AAF) อำเภอยะโฮรา จังหวัดสุราษฎร์ธานี นำลูกกุ้งขาว ขนาด 0.2-0.5 กรัม เลี้ยงในถังขนาด 40 ลิตร ที่ปรับความเค็ม 15 ppt แบ่งชุดทดลองเป็น 4 ชุด ชุดละ 5 ถัง ใน 1 ถังมีลูกกุ้ง 6 ตัว ทุกชุดการทดลองให้อาหารเม็ดที่ผสมน้ำมันปลาหมึก 5 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมอาหาร นำอาหารคลุกเคล้ากับกรดอะมิโนลิวซีนที่ละลายด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ และทำให้อาหารแห้งด้วยการอบในตู้อบลมร้อน (BINDER) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในการทดลองแบ่งชุดการทดลองได้ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 : อาหารที่ไม่ผสม 5ALA

ชุดการทดลองที่ 2 : อาหารที่ผสม 5ALA ความเข้มข้น 15 ppm

ชุดการทดลองที่ 3 : อาหารที่ผสม 5ALA ความเข้มข้น 30 ppm

ชุดการทดลองที่ 4 : อาหารที่ผสม 5ALA ความเข้มข้น 60 ppm

ในทุกชุดการทดลองให้อาหารกุ้งวันละ 3 ครั้ง ณ เวลา 08.00, 13.00 และ 18.00 น. โดยให้อาหารเริ่มต้นที่ 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน และเพิ่มขึ้นหรือลดลงในแต่ละมื้อตามความต้องการของกุ้ง ในระหว่างการทดลองมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำ ได้แก่ ค่าแอมโมเนียรวม (total ammonia nitrogen, TAN), ไนโตรเจน < 0.5 พีพีเอ็ม, ออกซิเจนละลายในน้ำ (dissolved oxygen, DO) > 5 พีพีเอ็ม, ความเป็นด่าง > 130 พีพีเอ็ม และ pH 7.0-8.0 เลี้ยงลูกกุ้งนาน 21 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำลูกกุ้งทุกตัวที่มีชีวิตชั่งน้ำหนักตัวสุดท้าย (final body weight, FBW) แล้วนำมาคำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (biomass increase) และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (survival rate, SR) จากสูตร

$$\text{Biomass increase} = \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย} \times \text{จำนวนตัวอย่างที่รอดชีวิต}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น} \times \text{จำนวนตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนกุ้งเริ่มต้น}} \times 100$$

นำกุ้งที่ซั้งน้ำหนักแล้วมาทำให้กุ้งสลบในน้ำแข็ง เก็บตัวอย่างตับกุ้งเพื่อตรวจการติดเชื้อ EHP วิเคราะห์ความเข้มข้นของ Adenosine triphosphate (ATP) และตรวจสอบทางพยาธิวิทยา ดังนี้

- การตรวจสอบการติดเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) สุ่มเก็บตัวอย่างตับ (hepatopancreas) ชุดการทดลองละ 10 ตัวอย่าง นำกุ้งมาผ่าด้วยมีดผ่าตัด แยกตับกุ้งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ที่มีแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร หลอดละ 1 ตัวอย่าง ใช้แท่งแก้วบดตัวอย่างตับให้ละเอียด นำหลอดตัวอย่างแช่เย็นในกล่องน้ำแข็งแห้ง นำเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อสกัดดีเอ็นเอภายใน 3 ชั่วโมง หรือเก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอสกัดดีเอ็นเอในวันถัดไป

- การวิเคราะห์ความเข้มข้นของ ATP ในตัวอย่างตับกุ้ง เก็บตัวอย่างตับกุ้งชุดการทดลองละ 10 ตัวอย่าง โดยนำตับกุ้งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์และเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ ATP

- การตรวจสอบทางพยาธิวิทยา สุ่มเก็บตัวอย่างตับกุ้งกลุ่มละ 5 ตัว แช่ในน้ำยา Davidson's fixative เก็บรักษาตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ย้ายตัวอย่างตับแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา

2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตับกุ้ง

สกัดดีเอ็นเอจากตับกุ้งด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit (OMEGA BIO-TEK) นำตัวอย่างตับกุ้งที่แช่อยู่ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ออกจากตัวอย่าง แบ่งตับกุ้ง 30 มิลลิกรัม นำมาบดด้วยแท่งบดพลาสติก (pestles) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว และเติม TL buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่ผสม proteinase K (OMEGA BIO-TEK) ลงไป 25 ไมโครลิตร นำหลอดบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ระหว่างที่บ่มให้ผสมสารด้วยการกลับหลอดไป-มาทุก ๆ 15 นาที เมื่อครบเวลาเติม RNase (OMEGA BIO-TEK) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มหลอดที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบน 150 ไมโครลิตร ย้ายลงหลอดใหม่ จากนั้นเติม BL buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และผสมสารด้วยการกลับหลอดไป-มา นำหลอดตัวอย่างบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาย้ายหลอดออกแล้วเติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 99.9 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด 250 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน ย้ายสารตัวอย่างทั้งหมดลง HiBind[®] DNA Mini Column ที่อยู่ใน Collection Tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ชะสารละลายออกจากหลอดด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสใน Collection Tube ที่เติม HBC buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง ปั่นเหวี่ยงสารที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทส่วนใสใน Collection Tube ที่เติม ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNA wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทส่วนใสใน Collection Tube ที่ทำซ้ำสองครั้ง ย้าย HiBind[®] DNA Mini Column ลงหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วชะดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลาย Elution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงหลอดที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที

นาน 15 วินาที ทำซ้ำสองครั้ง ดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพต่อไป

2.1.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาณน้อย (Nanodrop lite, Thermo Scientific) ดังนี้ นำดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร หยดลงในช่องโหลดตัวอย่างบันทึกผลปริมาณดีเอ็นเอที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และบันทึกค่าคุณภาพดีเอ็นเอจากสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (Optical Density; OD 260/280 นาโนเมตร) ถ้าอัตราส่วนมีค่าอยู่ในช่วง 1.7-1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี

2.1.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ตรวจสอบคุณภาพด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายด้วย 1X Tris-borate-EDTA Buffer (TBE Buffer) มีวิธีการเตรียมดังนี้ ชั่งอะกาโรสเจล 0.8 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 1X TBE นำไปหลอมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วรอให้เจลอุ่น เติม SYBR safe (Thermo Fisher Scientific) ความเข้มข้น 1,000X ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อสารละลายเจล 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำเจลเทลงบนแผ่นรองเจลที่มีหวีเสียบอยู่ รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เมื่อครบเวลาค่อย ๆ ยกหวีขึ้นจากเจลแล้วย้ายแผ่นรองเจลวางในแท่งรันเจลที่มีบัฟเฟอร์ 1X TBE อยู่ วางเจลให้จมบัฟเฟอร์โดยให้บัฟเฟอร์ท่วมผิวหน้าเจลอย่างน้อย 0.5 เซนติเมตร เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอโดยแบ่งดีเอ็นเอมา 5 ไมโครลิตร ผสมกับสี loading dye (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, และ 30% glycerol) 2 ไมโครลิตร โหลดตัวอย่างลงในช่องเจลแล้วตั้งกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นรองเจลไปตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ด้วยเครื่องวิเคราะห์เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation) รุ่น GEL Doc XR+ (BIO-RAD) เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) 1 kb (Promaga)

2.1.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ตรวจสอบการติดเชื้อรา EHP ในตับกึ่งด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่อง Thermal cycler (846-x-070-301, Biometra TOne 96G) โปรแกรมที่ใช้ตรวจสอบโรคแสดงในตารางที่ 4 ประกอบด้วยโปรแกรมที่ออกแบบจากยีน actin ซึ่งจำเพาะกับดีเอ็นเอของกึ่งโดยจะใช้เป็นปฏิกิริยาชุดควบคุม (internal control) และโปรแกรมที่จำเพาะกับโปรตีนบริเวณผิวสปอร์เชื้อรา EHP (spore wall protein, SWP) จำนวน 2 คู่ SWP1 สำหรับปฏิกิริยา first-step PCR และ SWP2 สำหรับ nested-step PCR ในการเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้น้ำยาเคมีสำเร็จรูป 5x HOT FIREPOL[®] DNA polymerase (Solis Bio-Dyne) ดังแสดงส่วนผสมในตารางที่ 5 กำหนดโปรแกรมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในชุดควบคุมตั้งค่าอุณหภูมิ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 55 องศา

เซลล์เชื้อ เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ตั้งค่าให้เกิดปฏิกิริยาซ้ำ 30 รอบ ตามด้วย final extension 5 นาที ส่วนปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอน first-step PCR ตั้งค่าโปรแกรม denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ให้เกิดปฏิกิริยาซ้ำ 30 รอบ ตามด้วย final extension 5 นาที และ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอน nested-step PCR ตั้งค่าอุณหภูมิ denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ให้เกิดปฏิกิริยาซ้ำ 20 รอบ ตามด้วย final extension 5 นาที

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำผลผลิตพีซีอาร์ 8 ไมโครลิตร ผสมกับสี loading dye 2 ไมโครลิตร รันตัวอย่างเจลด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่นเจลไปตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Solis BioDyne) นำภาพถ่ายวิเคราะห์ความรุนแรงของการติดเชื้อ EHP ด้วยวิธี semi-quantitative analysis โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบแบน EHP-positive กับแถบแบน actin ในชุดควบคุมด้วยใช้โปรแกรม Image J

ตารางที่ 4 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจการติดเชื้อ EHP ในตับกึ่ง

Primer	Sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Product size (bp)
Spore wall protein			
First-step			
SWP_1F	TTG-CAG-AGT-GTT-GTT-AAG-GGT-TT	58	514
SWP_1R	CAC-GAT-GT-GTC-TTT-GCA-ATT-TTC		
Nested step			
SWP_2F	TTG-GCG-GCA-CAA-TTC-TCA-AAC-A	64	148
SWP_2R	GCT-GTT-TGT-CTC-CAA-CTG-TAT-TTG-A		
Actin gene			
actin_F	CCT-CGC-TGG-AGA-AGT-CCT-AC	55	401
actin_R	TGG-TCC-AGA-CTC-GTC-GTA-CTC		

ที่มา: Jaroenlak *et al.* (2016)

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยาพีซีอาร์

PCR reaction mixture	Final concentration	Volume (μ l)
Internal control		
DNA template (25 ng/ μ l)	50 ng	2.0
10 μ M Actin_F	0.2 μ M	0.5
10 μ M Actin_R	0.2 μ M	0.5
5x HOT FIREPOL [®] DNA polymerase	1x	5
ddH ₂ O		17
Total volume		25
First-step PCR		
DNA template (25 ng/ μ l)	50 ng	2.0
10 μ M SWP_1F	0.2 μ M	0.5
10 μ M SWP_1R	0.2 μ M	0.5
5x HOT FIREPOL [®] DNA polymerase	1x	4
ddH ₂ O		13
Total volume		20
Nested-step PCR		
PCR product		2.0
10 μ M SWP_2F	0.2 μ M	0.5
10 μ M SWP_2R	0.2 μ M	0.5
5x HOT FIREPOL [®] DNA polymerase	1x	5
ddH ₂ O		17
Total volume		25

2.1.6 การตรวจสอบความเข้มข้น ATP ในตับกึ่ง

2.1.6.1 การสกัด ATP จากตับกึ่ง

ในการวิเคราะห์ ATP ของตัวอย่างตับจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการกำจัดโปรตีน (deproteinization) ออกจากสารสกัดเซลล์ตับ โปรตีนเหล่านี้เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่อาจรบกวนการวิเคราะห์ ATP วิธีการกำจัดโปรตีนใช้สารละลาย perchloric acid/potassium hydroxide (PCA/KOH) ซึ่งทำตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ATP Assay Kit (Cat. ab83355, Abcam) ดังนี้ นำตัวอย่างตับกึ่ง 10 มิลลิกรัม ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 1x PBS ที่เย็น เติม 2 N perchloric acid (PCA) ที่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วบ่มหลอดในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำหลอดปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่ออนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสด้านบนลงหลอดใหม่ เจือจางสารละลายด้วย ATP assay buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และกำจัด PCA ส่วนเกินออกจากปฏิกิริยาด้วยการเติม 2M KOH ที่เย็นจัดลงในสารละลาย 50-100 ไมโครลิตร ให้สารละลายมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.5-8 เพื่อให้ PCA ตกตะกอน (ปรับ pH ด้วย 0.1 N KOH หรือ 0.1 N PCA) นำตัวอย่างที่ปรับค่า pH แล้วปั่นตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่ออนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใ้ย้ายลงหลอดใหม่เพื่อรอการวิเคราะห์ ATP

2.1.6.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้น ATP

ตรวจสอบ ATP ในตับกึ่งด้วยชุดทดสอบ Colorimetric Assay Kit (Cat. ab83355, Abcam) ในการตรวจวัดปริมาณ ATP ด้วยวิธี colorimetric assay จะต้องเตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยาให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยการเตรียมเป็นส่วนผสมหลัก (master mix) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเตรียมส่วนผสมหลักของปฏิกิริยาการวิเคราะห์ความเข้มข้น ATP

Component	Reaction mix (μ l)
ATP assay buffer	44
ATP probe	2
ATP converter	2
Developer mix	2

นำส่วนผสมหลักของ reaction mix ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมนลงในจานหลุมไมโครเพลทที่มีสารสกัดตัวอย่าง (sample well) อยู่แล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารในจานหลุมให้เข้ากันบ่มสารที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ระวังอย่าให้โดนแสง หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาหรือภายใน 2 ชั่วโมงให้นำสารปฏิกิริยาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader

(SPECTROstar Nano, BMG LABTECH) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มา คำนวณหาความเข้มข้นของ ATP ดังสูตร

$$\text{ATP concentration (nmol/}\mu\text{l หรือ nM)} = \frac{B}{V} \times D \times \text{DDF}$$

B คือ ความเข้มข้น ATP ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน (nmol หรือ mM)

V (sample volume) คือ ปริมาตรของสารตัวอย่างที่เติมลงไปหลอด (μl)

D (sample dilution factor) คือ ค่าการเจือจางสารตัวอย่าง

DDF (deproteinization dilution factor) คือ ค่าการเจือจางสารสกัดในขั้นตอนการกำจัดโปรตีน

โดยที่

$$\text{DDF} = \frac{500 \mu\text{l} + \text{volume KOH } (\mu\text{l})}{\text{initial sample volume in PCA}}$$

2.1.6.3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน ATP

การคำนวณหาความเข้มข้นของ ATP จากสารสกัดตับ ต้องอาศัยการเปรียบเทียบค่าจากกราฟมาตรฐาน ATP ขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานมีดังนี้ เตรียมสารมาตรฐาน ATP ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ด้วยการเจือจาง ATP standard ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในน้ำ (ddH₂O) 90 ไมโครลิตร จากนั้นนำ ATP standard ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สร้างกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 7 นำส่วนผสมของสารมาตรฐานเติมลงในจานหลุมไมโครเพลท หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วเติม reaction mix (ตารางที่ 6) ลงไป 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ระวังอย่าให้โดนแสง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากแต่ละตัวอย่างลบกับค่าดูดกลืนแสงในชุดควบคุมน้ำกลั่น (blank) แล้วนำค่าที่ได้สร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ATP ในช่วงความเข้มข้น 0-12 นาโนโมลล์

ตารางที่ 7 ส่วนผสมของสารละลายสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน ATP

Standard no.	ATP 1 mM standard (μ l)	Assay buffer (μ l)	Final volume standard in well (μ l)	End amount ATP (nmol/well)
1	0	150	50	0
2	6	144	50	2
3	12	138	50	4
4	18	132	50	6
5	24	126	50	8
6	30	120	50	10
7	36	114	50	12

2.1.7 การตรวจสอบทางพยาธิวิทยา

นำชิ้นเนื้อตับจากตัวอย่างในทุกชุดการทดลองตรวจสอบเนื้อเยื่อวิทยา โดยเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Bell and Lightner (1988) มีวิธีการเตรียมพอสังเขปดังนี้ ต้องตัวอย่างชิ้นเนื้อในน้ำยา Davison's fixative ไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง และนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เนื้อเยื่อจะถูกแช่ไว้ในแอลกอฮอล์เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อไปแช่ใน xylene เนื่องจาก xylene เป็นสารที่สามารถละลายในพาราฟินทำให้เนื้อเยื่อใส โดยขั้นตอนนี้เรียกว่า clearing นำชิ้นเนื้อไปฝัง (embedding) ใน paraffin block ตัดชิ้นเนื้อ (sectioning) ที่อยู่ในแท่งพาราฟินให้เป็นแผ่นบาง ๆ ด้วยเครื่อง Microtome (HESTION) ความหนา 4-5 ไมครอน แล้วจัดวางเนื้อเยื่อบนสไลด์ ย้อมเนื้อเยื่อ (staining) ด้วยสี hematoxylin และ phloxine (H&P) นำสไลด์ที่ได้ส่งดูลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) (Leica DM) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยตรวจหาสปอร์ในระยะต่างๆ ตรวจสอบลักษณะของทอลูเมนและขนาดของ vacuole ภายใน B-cell ทำโดยสุ่มตัวอย่างดับกึ่ง 2 ตัวอย่าง จากแต่ละชุดการทดลอง ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (n=6) ซ้ำละ 10 ตำแหน่ง เพื่อตรวจหาอาการ atrophic tubules การวัดขนาดพื้นที่ vacuole ภายใน B-cell ให้สุ่มเลือก 10 ตำแหน่ง ๆ ละ 20 เซลล์ (B cell 400 เซลล์) นำข้อมูลวิเคราะห์พื้นที่ของเวคคิวโอลด้วยโปรแกรม Image J

2.1.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS หาค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบจำแนกทางเดียว (One way analysis of variances) และเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลด้วยวิธีของ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

2.2 วัสดุและอุปกรณ์

2.2.1 สารเคมี

1. แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 99.9 เปอร์เซ็นต์
2. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (OMEGA BIO-TEK)
3. น้ำกลั่น (Distilled water)
4. สีย้อม Hematoxylin (BIOTECH)
5. สีย้อม phloxine B
6. 1 kb DNA marker (Promega)
7. 100 bp DNA marker (Solis BioDyne)
8. 1X TBE
9. 5x HOT FIREPOL® DNA polymerase (Solis BioDyne)
10. 6X loading dye
11. Agarose
12. ATP Assay Kit (Abcam)
13. Davidson's fixative
14. Perchloric acid (PCA)
15. 0.1 N Perchloric acid (PCA)
16. 0.1 N Potassium hydroxide (KOH)
17. RNase (OMEGA BIO-TEK)
18. SYBR Safe (invitrogen)
19. Xylene

2.2.2 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
2. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
3. เครื่องชั่งดิจิตอล (Digital Balance)
4. เครื่องตัดบล็อกชิ้นเนื้อ (Microtome)

5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermal Cycler)
6. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
8. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมปริมาณน้อย (Nanodrop lite)
9. เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel documentation)
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifugation)
11. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifugation)
12. เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader)
13. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
14. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
15. ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette)
16. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)
19. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

2.2.3 อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
2. จานหลุมไมโครเพลท (96 well plate)
3. ตัวยับพลาสติก (Pestles)
4. ปิเปตทิป (Pipette Tips)
5. หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (Microcentrifuge tube)
6. Paraffin block

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การศึกษาผลของ 5-ALA ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ EHP

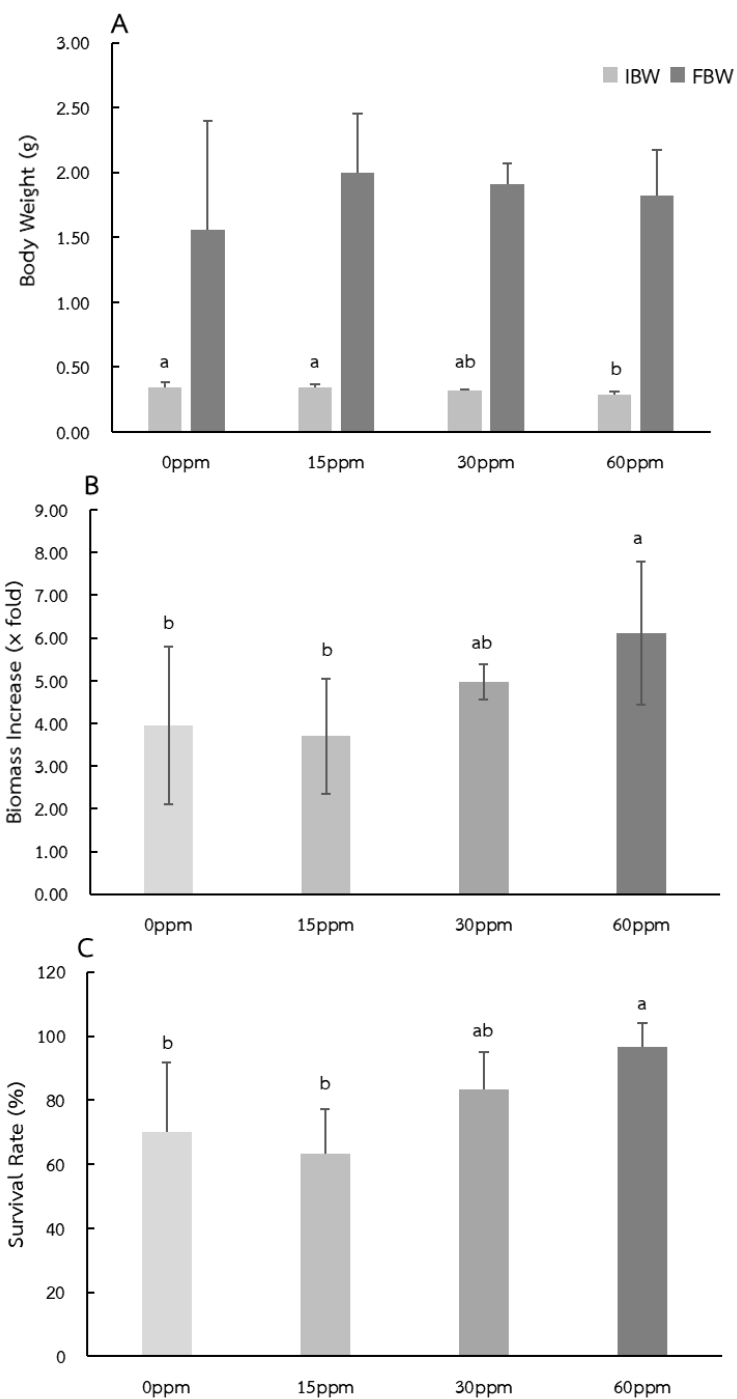
ศึกษาผลของ 5-ALA ที่เสริมในอาหารกุ้งที่ความเข้มข้น 0 15 30 และ 60 ppm ต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้ง พบว่า กุ้งให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวในวันเริ่มต้นของการเลี้ยงแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเลี้ยงกุ้งที่มีการเสริมและไม่เสริมอาหารด้วย 5-ALA นาน 21 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายของการเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 8 ภาพที่ 13A) แต่กุ้งในทุกชุดการทดลองให้ค่าการรอดชีวิตที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยกุ้งที่ให้ ALA60 มีค่าการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น ALA30 มีค่าเท่ากับ 83 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวให้ค่าการรอดชีวิตสูงกว่ากุ้งที่เลี้ยงด้วย ALA0 และ ALA15 (ตารางที่ 8 ภาพที่ 13C)

เมื่อพิจารณาค่าการเติบโตที่เพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวกุ้งตลอดการเลี้ยง (biomass increase) พบว่า การเสริมอาหารกุ้งด้วย ALA30 และ ALA60 เพิ่มมวลน้ำหนักตัวกุ้งได้ดี โดยเฉพาะ ALA60 สามารถส่งเสริมมวลน้ำหนักได้เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 8 ภาพที่ 13B)

ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้ง *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ EHP เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 21 วัน

Parameter	ALA0	ALA15	ALA30	ALA60	sig
Initial Weight (g)	0.35±0.04 ^a	0.35±0.02 ^a	0.32±0.01 ^{ab}	0.29±0.02 ^b	0.01
Final Weight (g)	1.92±0.45	2.00±0.46	1.86±0.28	1.82±0.35	ns
Biomass Increase (x fold)	3.96±1.84 ^b	3.70 ±1.34 ^b	4.97±0.42 ^{ab}	6.12±1.68 ^a	0.05
Survival Rate (%)	70.00±21.73 ^b	63.00±13.94 ^b	83.00±11.79 ^{ab}	97.00±7.45 ^a	0.05

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($p < 0.05$)



ภาพที่ 13 การเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของกุ้ง *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ EHP เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 15 30 และ 60 ppm เลี้ยงนาน 21 วัน IBW: initial body weight, IBM: final body weight

3.2 การศึกษาพยาธิวิทยาของตับกึ่งที่ได้รับอาหารเสริม 5-ALA

จากการตรวจพยาธิสภาพของตับกึ่งพบลักษณะท่อตับ (hepatopancreatic tubule) มีจำนวนเซลล์เยื่อบุชนิด cuboidal epithelium น้อยลง เซลล์เยื่อบุมีขนาดเล็กและลึบลงส่งผลให้ช่อง lumen ขยายขนาดใหญ่ขึ้น เรียกลักษณะอาการเช่นนี้ว่า atrophic tubules (ภาพที่ 14A) ภายในตับกึ่งตรวจพบเซลล์แต่ละประเภทรวมถึง B-cell นอกจากนี้ยังตรวจพบท่อ lumen ขนาดเล็กที่มีลักษณะรูปดาวแฉก (star-shaped lumen) ซึ่งเป็นลักษณะท่อตับที่เป็นปกติ บริเวณเซลล์เยื่อบุท่อตับส่วนปลาย (the epithelium of the distal tubules) พบเฉพาะ E-cell จำนวนมาก (ภาพที่ 14C)

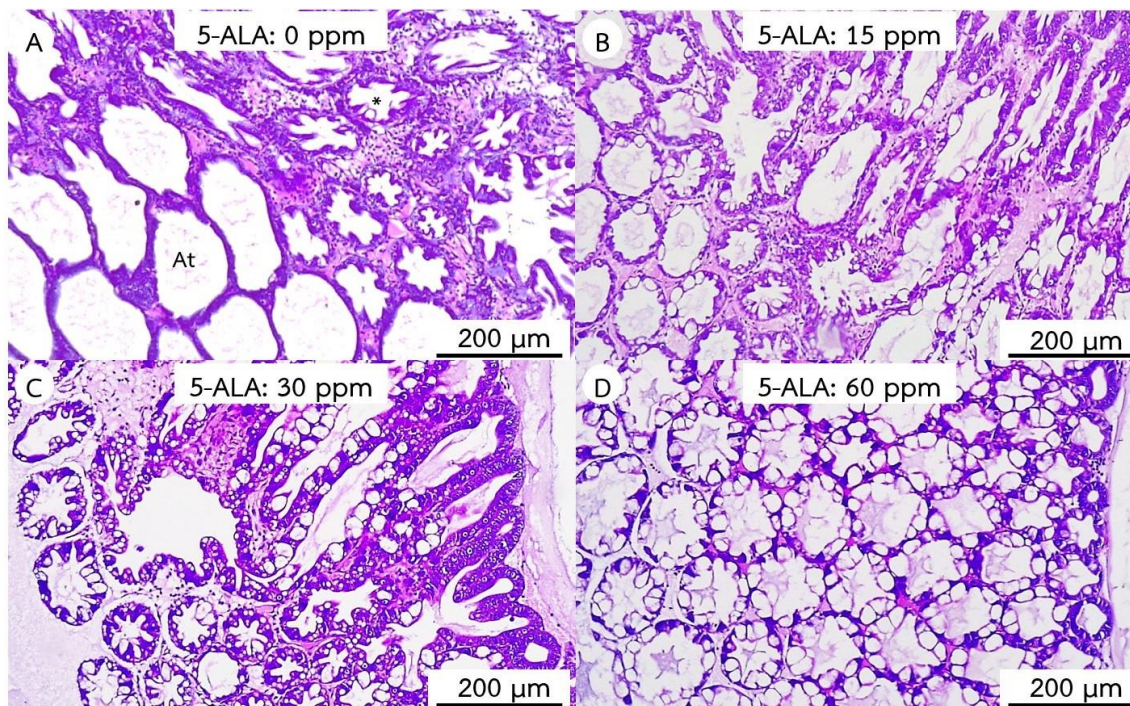
วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ atrophic tubules ในชุดควบคุมและ ALA15 พบว่ามีค่าเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ALA30 และ ALA60 เซลล์ตับแสดงอาการ atrophic tubules ลดลง เท่ากับ 7 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสองกลุ่มแรก ($p < 0.05$) (ภาพที่ 15A) และจากผลการทดลองพบความแตกต่างของ B-cell ซึ่งพบว่า B-cell มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อมีการเสริม 5-ALA ในอาหารกึ่งโดยเฉพาะในชุดการทดลอง ALA60 (ภาพที่ 14D)

วิเคราะห์ค่าพื้นที่เฉลี่ยของ vacuole ของ B-cell พบว่า ALA30 และ ALA60 มีค่าพื้นที่อยู่ระหว่าง 340-370 mm² ในขณะที่ ALA0 และ ALA15 มีพื้นที่เฉลี่ย 210-250 mm² (ภาพที่ 15B) ซึ่งจะเห็นได้ว่าพื้นที่ vacuole ของ ALA30 และ ALA60 มีขนาดใหญ่กว่าอีกสองกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

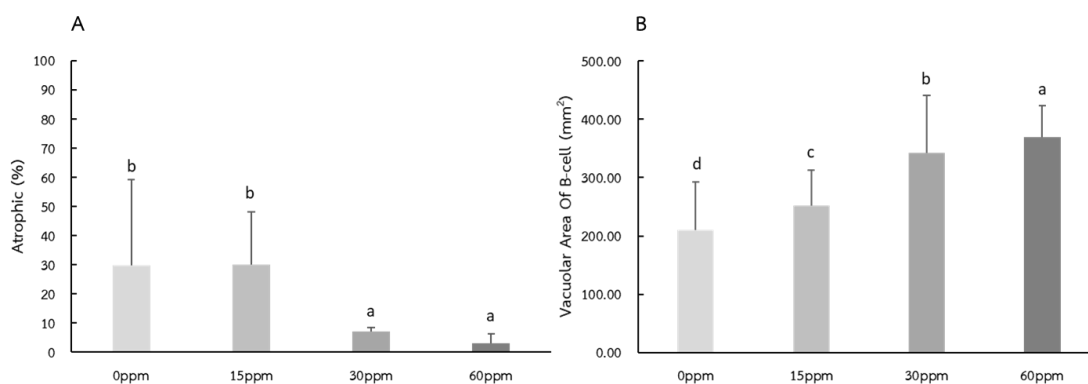
ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ atrophic tubule และค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ vacuole ภายใน B-cell ของตับกึ่ง *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ EHP เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 21 วัน

Parameter	ALA0	ALA15	ALA30	ALA60	sig
Atrophic Tubule (%)	29.65±29.49 ^b	29.93±18.15 ^b	7.22±1.15 ^a	3.01±3.25 ^a	0.05
Vacuolar Area					
Of B-cell (mm ²)	210.54±81.67 ^d	251.40±61.56 ^c	342.07±99.33 ^b	368.67±54.43 ^a	0.01

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($p < 0.05$)



ภาพที่ 14 พยาธิสภาพของตับกึ่งที่ติดเชื้อ EHP ที่ได้รับอาหารเสริม 5-ALA ความเข้มข้น 0 ppm (A) 15 ppm (B) 30 ppm (C) และ 60 ppm (D) At แสดง atrophic tubule และ * แสดงลักษณะเซลล์ปกติ



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์ atrophic tubule (A) และค่าเฉลี่ยพื้นที่ vacuole ภายใน B-cell ของตับกึ่ง *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ EHP ซึ่งได้รับอาหารเสริม 5-ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ๆ

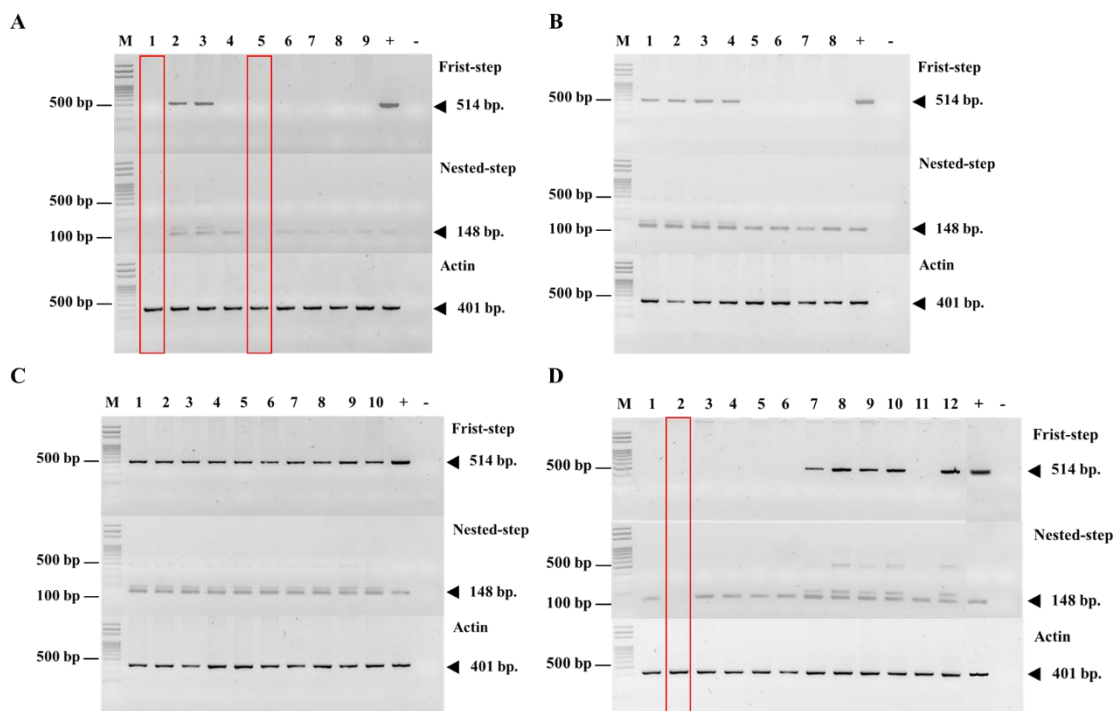
3.3 การตรวจการติดเชื้อ EHP ในตับกุ้ง

จากการตรวจการติดเชื้อ EHP ในตับกุ้งด้วย nested PCR พบว่ากุ้งมีอัตราการติดเชื้อรวมทั้งหมดเท่ากับ 92.3 เปอร์เซ็นต์ โดยมีอัตราการติดเชื้อในกลุ่ม 0, 15, 30 และ 60 ppm เท่ากับ 77.8, 100, 100 และ 91.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 16) และพบว่ากุ้งมีความรุนแรงในการติดเชื้อ EHP เพิ่มขึ้น เมื่อกุ้งได้รับอาหารที่เสริมด้วย 5-ALA ที่ระดับ 30 และ 60 ppm โดยสามารถตรวจพบเชื้อทั้งใน first-step PCR และ nested PCR (ภาพที่ 16C และ 16D) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า การเสริมอาหารกุ้งด้วย 5-ALA ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อ EHP ในตับของกุ้งที่ติดเชื้อได้ และอาจช่วยส่งเสริมให้เชื้อ EHP เพิ่มปริมาณในตับกุ้งได้สูงขึ้น

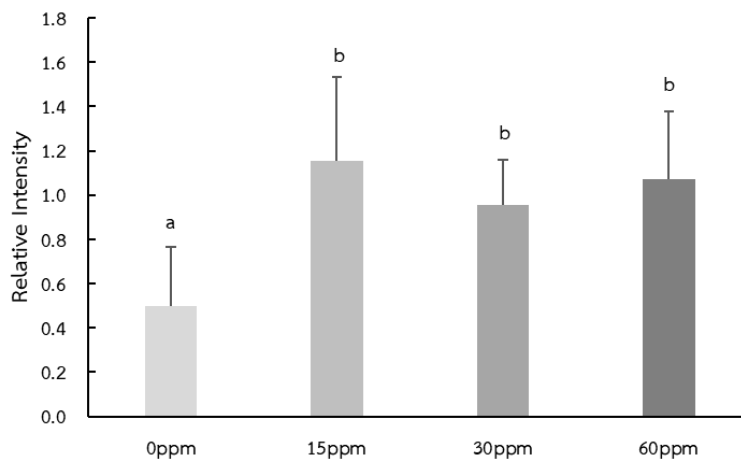
เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์ค่า semi-quantitative โดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากปฏิกิริยา nested PCR เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จาก β -actin พบว่า ค่าความสัมพันธ์ของความเข้มมีค่าสูงขึ้นเมื่อกุ้งได้รับการเสริมด้วย ALA ในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (ALA15, ALA30 และ ALA60) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับค่าความรุนแรงของการติดเชื้อในตับกุ้งที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 17)

จากที่ได้กล่าวไปแล้วว่ากุ้งส่วนใหญ่มีการติดเชื้อ EHP แต่พบกุ้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อตรวจด้วย nested PCR ไม่พบการติดเชื้อโดย 2 ตัวอย่าง มาจากชุดควบคุมและ 1 ตัวอย่างมาจาก ALA60 (ภาพที่ 16A และ 16D) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ากุ้งบางตัวอาจมีสุขภาพดี จึงมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ EHP ได้

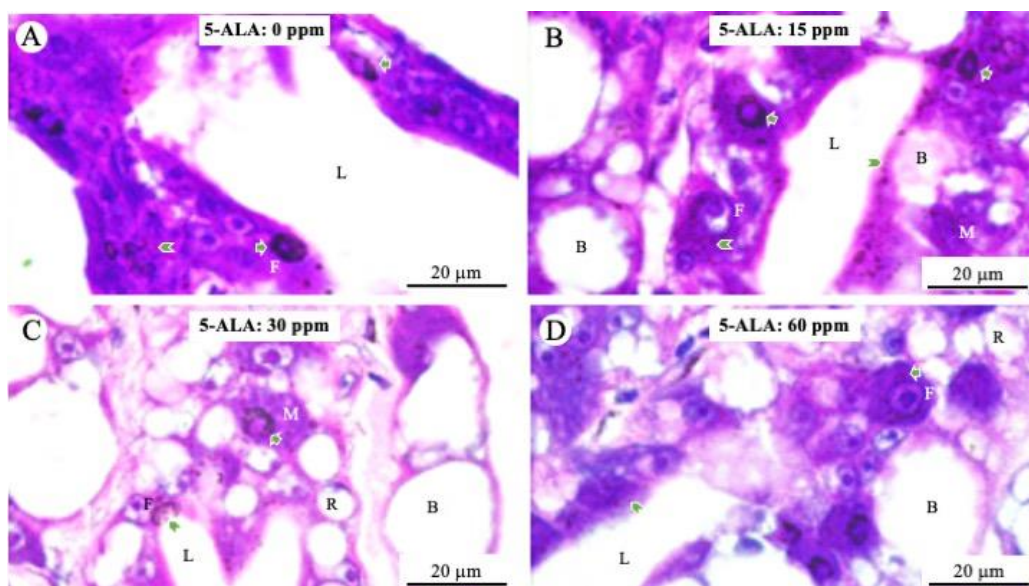
ผลการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาพบแกรนูล (granule) ติดสีแดงขนาดประมาณ 1 μ m เกาะรวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่กระจ่ายเป็นเม็ดภายในเซลล์ตับ (ภาพที่ 18) ซึ่งกลุ่มแกรนูลที่อยู่รวมกันนี้ประกอบด้วยเซลล์ของ EHP ซึ่งเป็น vegetative cell ที่อยู่ในระยะต่าง ๆ เช่น พลาสโมเดียม สปอโรบลาสต์ หรือสปอร์โรไซต์ ส่วนเม็ดแกรนูลที่กระจ่ายทั่วทั้งเซลล์ตบนั้นเป็นสปอร์ของ EHP นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อ EHP อยู่ภายใน M-cell และ F-cell ได้สูงกว่า R-cell และ B-cell โดยอยู่ในระยะต่าง ๆ กัน จากภาพการทดลองพบเม็ดสปอร์ของ EHP ถูกปลดปล่อยออกจาก F-cell เข้าสู่ท่อตับ (ภาพที่ 18C)



ภาพที่ 16 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการตรวจตัวอย่างตั๊กด้วย nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SWP ที่จำเพาะกับเชื้อ EHP และไพรเมอร์ actin gene (internal control) ตัวอย่างที่ตรวจเชื้อเป็นกุ้งที่ได้รับอาหารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้น 0 15 30 และ 60 ppm (A-D) กรอบสีแดงแสดงตัวอย่างกุ้งที่ตรวจไม่พบเชื้อ EHP สัญลักษณ์ M คือ 100 bp DNA marker; + คือ positive control (pGEM-SWP); - คือ negative control (H₂O) ตัวเลขบนเลนส์แสดงตัวอย่างกุ้งที่นำมาตรวจพีซีอาร์



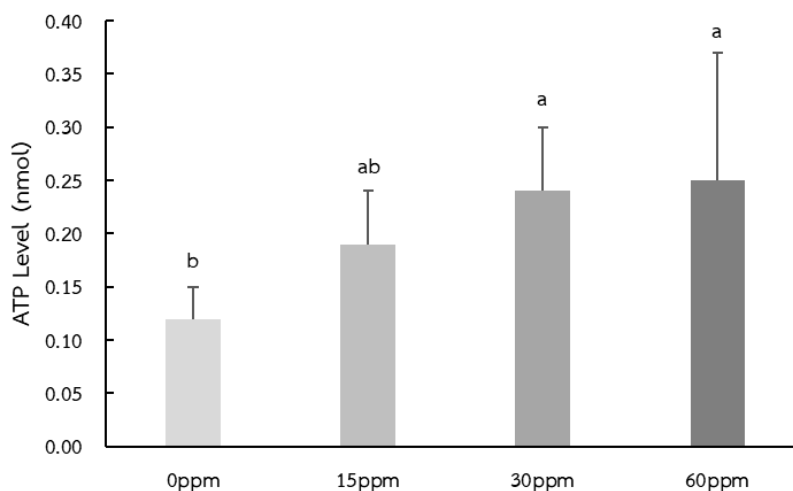
ภาพที่ 17 ความเข้มของแบนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของปฏิกิริยา nested PCR เปรียบเทียบกับแบนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ β -actin ในกิ่งที่ติดเชื้อ EHP ที่เสริม 5-ALA ความเข้มข้น 0 ppm, 15 ppm, 30 ppm และ 60 ppm



ภาพที่ 18 พยาธิวิทยาของต้นกล้าที่ติดเชื้อ EHP และได้รับสารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้น 0 ppm (A) 15 ppm (B) 30 ppm (C) และ 60 ppm (D) ในภาพแสดงลักษณะเชื้อ EHP ที่อยู่ภายในเซลล์ตับเป็นเม็ดแกรนูลดีดสีแดงเกาะกลุ่มกัน ซึ่งเป็นเชื้อที่อยู่ในระยะพลาสมเดียม สปอโรลาสต์ หรือสปอร์โรไซต์ (ลูกศร) และเม็ดสปอร์ของเชื้อกระจายอยู่ทั่วภายในต้นกล้า (หัวลูกศร)

3.4 การตรวจระดับความเข้มข้น ATP ในตับกุ้ง

นำตับกุ้งที่ติดเชื้อมาตรวจหาความเข้มข้น ATP พบว่ากุ้งที่เสริมด้วย 5-ALA ในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นมีความเข้มข้นของ ATP ในตับที่เพิ่มขึ้นด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่ากุ้งในชุด ALA15, ALA30 และ ALA60 มีปริมาณ ATP เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า, 2 เท่า และ 2.1 เท่า ตามลำดับ ซึ่งกุ้งในกลุ่ม ALA 30 และ ALA 60 มีความเข้มข้นของ ATP ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($p < 0.05$) (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ความเข้มข้นของ ATP ในตับกุ้ง *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ EHP และได้รับสารเสริม 5-ALA

บทที่ 4

วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของ 5-ALA ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาว *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ EHP พบว่ากุ้งที่ให้อาหารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้น 60 ppm/kg มีอัตราการรอดชีวิต น้ำหนักตัวกุ้ง และปริมาณ ATP ภายในตับกุ้งเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม 5-ALA กลับช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเชื้อราในตับ จากข้อมูลที่ว่า 5-ALA เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์ฮีม (heme) ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ที่อยู่บริเวณ prosthetic site ของเอนไซม์ไซโตโครม เอนไซม์ชนิดนี้มีความสำคัญต่อการสร้างพลังงาน (ATP) ผ่านกระบวนการ electrons transport chain (ETC) ที่เกิดจากการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (Ogura et al., 2011, Hara et al., 2016; Ota et al., 2017) จากทฤษฎีนี้จึงทำให้กุ้งที่ติดเชื้อ EHP ในกลุ่มทดลองที่เสริมอาหารด้วย 5-ALA มีการสังเคราะห์ ATP ภายในตับกุ้งเพิ่มขึ้น และงานวิจัยครั้งนี้ก็สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pendrosa-Gerasmio et al. (2018) ที่รายงานว่า 5-ALA สามารถเพิ่มการสร้าง ATP ภายในตับกุ้งได้ จึงเป็นไปได้ว่าเซลล์ตับของกุ้งที่ติดเชื้อ EHP สามารถสร้างพลังงานเพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกัน แล้วนำพลังงานส่วนนี้ไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม และฟื้นฟูการทำงานของเซลล์ตับที่ถูกทำลาย และจากผลการทดลองพบตับกุ้งในกลุ่มที่เสริม 5-ALA ในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นแสดงอาการ atrophic tubule ลดลง รวมถึงพื้นที่แควิวโอลภายใน B cell มีขนาดใหญ่ขึ้น จึงเป็นการสนับสนุนว่า B cell ของเซลล์ตับสามารถกลับมาทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับเซลล์ปกติ

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์เยื่อของท่อตับกุ้ง (hepatopancreatic tubular epithelium) ประกอบด้วยเซลล์ 5 ชนิด คือ E-, M-, R-, F- และ B-cells (Hu & Leung, 2007; Nunes et al. 2014; Vogt, 2019) โดยที่ Vogt (2019) ได้ศึกษาหน้าที่ของเซลล์ตับเยื่อแต่ละชนิดในสัตว์น้ำกลุ่มกุ้งและปู (decapod crustacean) ด้วยวิธีทาง immunohistochemistry *in situ* hybridization และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่แตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถสรุปหน้าที่ของเซลล์แต่ละชนิดได้ดังนี้ E-(embryonic)-cells เป็นเซลล์ที่อยู่บริเวณปลายของ epithelial tubules เป็นเซลล์ต้นแบบที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนเพื่อทดแทนเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่ตายไป R (resorptive)-cells เป็นเซลล์ที่มีแควิวโอลขนาดเล็กจำนวนมากภายในเซลล์ ทำหน้าที่ในการสะสมสารอาหารที่ดูดซึมได้ เก็บสะสมพลังงานและเกลือแร่ สังเคราะห์ลิโปโปรตีนเพื่อส่งออกไปยังอวัยวะอื่น ลำไส้พิชโลหะหนัก และซักรครดยูริก F (fibrillary)-cells มีหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ย่อยอาหารและสร้างโปรตีนในเลือดที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งออกซิเจนและระบบภูมิคุ้มกัน B (blister)-cells เป็นเซลล์ที่มีแควิวโอลเดี่ยวขนาดใหญ่ทำหน้าที่สร้างและเก็บสะสมไขมันไว้ในแควิวโอล และ M-cells ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจจะเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตฮอโมน มีรายงานว่า B-cell สามารถหลั่งเอนไซม์หรือสารที่ผลิตขึ้นเข้าสู่ท่อตับด้วยกลไก holocrine secretion (Vogt, 1994) นอกจากนี้ Hu and Leung (2007) รายงานว่า B-cell สะสม cathepsin L ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด endopeptidase ในขณะที่

ที่ F-cells ตรวจพบการแสดงออกของยีน *CatL* ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ cathepsin L จากหลักฐานดังกล่าวจึงคาดว่า F- และ B-cell อาจเป็นเซลล์ชนิดเดียวกันแต่อยู่ในระยะการพัฒนาที่ต่างกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ากุ้งที่ไม่ได้รับ 5-ALA มีค่าเฉลี่ยของขนาดพื้นที่แควิวโอลภายใน B-cell น้อยที่สุด ในขณะที่กุ้งที่ได้รับ 5-ALA ที่ความเข้มข้น 30 และ 60 ppm มีค่าเฉลี่ยของขนาดพื้นที่แควิวโอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่ามีการสะสมของไขมันและหรือ cathepsin L ภายในแควิวโอลเพิ่มมากขึ้นหลังจากได้รับอาหารเสริม 5-ALA ดังนั้น ถ้า F-cell เป็นเซลล์ตั้งต้นของ B-cell (Hu and Leung, 2007) อาจสามารถสรุปได้ว่า 5-ALA ช่วยส่งเสริมการทำงานของ F-cell ทำให้เกิดการสะสมเอนไซม์ที่ช่วยในย่อยอาหารภายในแควิวโอลเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งในชุดควบคุม ดังนั้น 5-ALA อาจส่งเสริมให้กุ้งที่ติดเชื้อ EHP มีระบบการย่อยอาหารที่ดีและได้รับสารอาหารที่เป็นประโยชน์ จึงช่วยให้อัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ EHP ลดลงได้ อย่างไรก็ตาม การรอดชีวิตของกุ้งที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังจากกุ้งได้รับ 5-ALA อาจเกิดจากปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง จากข้อมูลที่ว่าตับเป็นแหล่งผลิตสารเปปไทด์ต้านจุลชีพและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ ซึ่งยังไม่มีข้อมูลยืนยันว่าเซลล์ชนิดใดของตับที่ทำหน้าที่ผลิตเปปไทด์หรือโปรตีนดังกล่าว (Tassanakajon et al., 2013, Tseng et al., 2002, Yang et al., 2018, Zhang et al., 2004; Pendrosa- Gerasmio et al., 2018) ดังนั้น การเพิ่มขึ้นการสร้าง ATP จากการให้กุ้งกินอาหารผสม 5-ALA เป็นการช่วยให้เซลล์ตับสามารถกลับมาสร้างสารเปปไทด์ต้านจุลชีพ และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบให้อยู่ในระดับเดิมได้ ส่งผลให้กุ้งมีการตายลดลงดังเช่นผลการวิจัยที่ให้กุ้งกินอาหารผสม 5-ALA ช่วยลดการตายของกุ้งที่มีการติดเชื้อ AHPND (Pendrosa-Gerasmio et al., 2018; 2019; Direkbusarakom et al., 2021)

จากการศึกษาพบว่าปริมาณสารเสริม 5-ALA มีแนวโน้มส่งเสริมปริมาณเชื้อ EHP ภายในตับ ซึ่งจากข้อมูลที่ว่าสารเสริม 5-ALA ช่วยเพิ่มการสร้าง ATP ทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์ที่ติดเชื้อ EHP ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของพลังงานภายในเซลล์ส่งผลให้เชื้อ EHP สามารถดึงพลังงานที่ตับผลิตไปใช้ในการเพิ่มจำนวน จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า 5ALA ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการเมแทบอลิซึมในกุ้ง ได้แก่ กระบวนการย่อยและการดูดซึม ระบบภูมิคุ้มกัน กระบวนการลอกคราบ และเพิ่มมวลน้ำหนักตัวกุ้ง แต่ในด้านลบกลับช่วยส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อ EHP จากข้อเท็จจริงนี้จึงควรมีการศึกษาเพื่อพิสูจน์ผลกระทบดังกล่าวนี้ว่าจะเกิดขึ้นกับการเพาะเลี้ยงกุ้งในระบบฟาร์มหรือไม่ และจากการศึกษาในครั้งนี้พบกุ้ง 3 ใน 36 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจโรคด้วย nested-PCR เป็นลบ นั่นคือตัวอย่างกุ้งประมาณ 8% ของกุ้งทั้งหมด อาจแสดงความต้านทานต่อเชื้อ EHP ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการเพิ่มจำนวนประชากรกุ้งเพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ให้ชัดเจนขึ้น และศึกษากลไกความต้านทานของกุ้งต่อเชื้อ EHP ซึ่งอาจทำให้ได้สายพันธุ์กุ้งขาวที่ต้านทานต่อเชื้อ EHP ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งในอนาคต

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การให้กุ้งขาว *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ EHP กินอาหารเม็ดเสริมด้วย 5-ALA ที่ความเข้มข้น 60 ppm/kg ช่วยลดการตายและเพิ่มมวลน้ำหนักตัว นอกจากนี้ การเสริมอาหารด้วย 5-ALA สามารถลดพยาธิสภาพของการเกิดโรค กระตุ้นการสร้างพลังงาน และเพิ่มจำนวนเชื้อราในตับกุ้ง สิ่งเหล่านี้อาจเป็นไปได้ว่า 5-ALA ช่วยส่งเสริมการสร้างฮีโมโพรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมโพรตีนให้มีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นในตับกุ้ง กลุ่มโปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญต่อการสร้างพลังงานของเซลล์ด้วยระบบ ETC ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง และกระบวนการลอกคราบ อย่างไรก็ตาม พลังงานที่ถูกสร้างเพิ่มขึ้นในกุ้งที่ติดเชื้อ EHP ทำให้เชื้อมีพลังงานเพียงพอในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนด้วยเช่นกัน

บรรณานุกรม

- จิตรลดา ศรีตระกูล และ พชรินทร์ ลังกาปอน. 2563. สถานการณ์สินค้ากุ้งทะเลและผลิตภัณฑ์ปี 2563. กลุ่ม เศรษฐกิจการประมง กองนโยบายและแผนพัฒนาการประมง
- ชนกันต์ จิตต์มนัส. 2556. ผลของผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรต่อภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ. *KKU Research Journal* ครั้งที่ 18 หน้า 257-269.
- นนทวิทย์ อารีชัย, ดวงใจ กิตติปรัชากุล, และ ชุมพล ศรีทอง. 2549. การใช้แอสตาแซนทินจากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* กับกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* Fabricius. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 หน้า 252-265.
- นิรอยฮานนะห์ นิมา. 2563. การติดเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* ในเซลล์ต่างๆ ใน hepatopancreas ของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี.
- มฤดี สนิ. 2559. การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล. *วารสารแก่นเกษตร* ครั้งที่ 44 (2) หน้า 373-382
- วิรุฬห์ศักดิ์ ทองสุภา นเรศ ช้วนยุค อังคณา ไส้เกื้อ และศุภณัฐ ธาณรัตน์. 2020. ผลของกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์. *วารสารวิชา. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช* ครั้งที่ 39 หน้า 16-30.
- สมพร ยีสมัน. 2552. การศึกษาคุณภาพน้ำที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) แบบพัฒนาในบ่อปูพื้นด้วยโพลีเอทิลีน (Polyethylene, PE) ในฤดูกาลที่ต่างกัน. สาขาวิชาการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร จังหวัดชุมพร
- อมรรัตน์ ตั้งประสิทธิ์ภาพ. 2549. การผลิตกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกภายในเซลล์จาก *Rhodobacter sphaeroides* SH5 และผลต่อการเจริญเติบโตและกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.
- Aldama-Cano, DJ., Sanguanrut, P., Munkongwongsiri, N., Ibarra-Gámez, JG., Itsathitphaisarn, O., Vanichviriyakit, R., Flegel, TW., Sritunyalucksana, K. and Thitamadee, S. 2018. Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Aquaculture*. 490: 156-161.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulant, adjuvant, and vaccine carriers in fish: Application to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 281-307.
- Anderson, I.G., Shariff, M., Nash, G. 1989. A hepatopancreatic microsporidian in pond-reared tiger shrimp, *Penaeus monodon*, from Malaysia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53: 278-280.

- Angthong, P., Roytrakul, S., Jarayabhand, P. and Jiravanichpaisal, P. 2017. Characterization and function of a tachylectin 5-like immune molecule in *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 76: 120-131.
- Babu, D.T., Anthony, S.P., Joseph, S.P., Bright, A.R. and Philip, R. 2013. Marine yeast *Candida aquatextoris* S527 as a potential immunostimulant in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112: 243-252.
- Bai, N., Gu, M., Zhang, W., Xu, W. and Mai, K. 2014. Effects of β -glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*. 426-427: 66-73.
- Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C. and kumar, V. 2013. Immunostimulants for aquaculture health management. *Journal of Marine Science: Research & Development*. 3: 134.
- Bell, Thomas A., Lightner, Donald V. 1998. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society.
- Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2: 498-503.
- Chaijarasphong, T., Munkongwongsiri, N., Stentiford, G.D., Aldama-Cano, D.J., Thansa, K., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. and Itsathitphaisarn, O. 2021. The shrimp microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP): Biology, pathology, diagnostics and control. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Chang, Y-P., Liu, C-H., Wu, C-C., Chiang, C-M., Lian, J-L. and Hsieh, S-L. 2012. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*. 32: 284-290.
- Chayaburakul, K., Nash, G., Pratanpipat, P., Sriurairatana, S. and Withyachumnarnkul, B. 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*. 60: 89-96.
- Chen, YJ., Kim, IH., Cho, JH., Min, BJ., Yoo, JS. and Wang, Q. 2008. Effect of δ -aminolevulinic acid on growth performance, nutrient digestibility, blood parameters and the immune response of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Livestock Science*. 114: 108-16.

- Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K. and Didier, P.J. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*. 126: 145-166.
- Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. 1996. Protective efficacy of *nutans* on yellow-head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*. 33: 404-410.
- Dugassa H. and Gaetan D. 2018. Biology of White Leg Shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 10 (2): 05-17.
- Fujii, C., Miyashita, K., Mitsuishi, M., Sato, M., Fujii, K., Inoue, H., Hagiwara, A., Endo, S., Uto, A., Ryuzaki, M., Nakajima, M., Tanaka, T., Tamaki, M., Murak, A., Kawai, T. and Itoh, H. 2017. Treatment of sarcopenia and glucose intolerance through mitochondrial activation by 5-aminolevulinic acid. *Scientific Reports*. 7(1): 4013.
- Hai, V.N. 2015. The use of medicinal plants immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*. 446: 88-96.
- Hara, T., Koda, A., Nozawa, N., Ota, U., Kondo, H., Nakagawa, H., Kamiya, A., Miyashita, K., Itoh, H., Nakajima, M., Tanaka, T. 2016. Combination of 5-aminolevulinic acid and ferrous ion reduces plasma glucose and hemoglobin A1c levels in Zucker diabetic fatty rats. *FEBS Open Bio* 6: 515–528.
- Hu, K-J., Leung, P-C. 2007. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 146: 69–80.
- Hudson, D.A., Hudson, N.B., Pyecroft, S.B. 2001. Mortalities of *Penaeus japonicus* prawns associated with microsporidean infection. *Australian Veterinary Journal*. 79: 504-505.
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S. and Palavesam, A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish and Shellfish Immunology*. 32: 551-564.
- Inoue K. 2017. 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder cancer. *International Journal of Urology*. 24: 97–101.
- Jaroenlak, P., Sanguanrut, P., Williams, B.A., Stentiford, G.D., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. and Itsathitphaisarn, O. 2016. A Nested PCR assay to avoid false positive

- detection of the Microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms. PLOS ONE. 11: 11.
- Jiuzhou. 2020. Global 5-aminolevulinic acid hydrochloride market growth 2019–2024. (ออนไลน์: <https://www.360researchreports.com/global-5-aminolevulinic-acid-hydrochloride-market-13902563>) (สืบค้นเมื่อ 30 Jan 2020)
- Kang, Z., Zhang, J.L., Zhou, J.W., Qi, Q.S., Du, G.C. and Chen, J. 2012. Recent advances in microbial production of δ -aminolevulinic acid and vitamin B12. Biotechnology Advances. 30: 1533–42.
- Kiatpapan, P., Phonghatsabun, M., Yamashita, M., Murooka, Y. and Panbangred, W. 2011. Production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* TISTR442. Journal of Bioscience and Bioengineering. 111(4): 425-428.
- Kitikiew, S., Chen, J.-C., Putra, D. F., Lin, Y.-C., Yeh, S.-T. and Liou, C.-H. 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. Fish and Shellfish Immunology. 34: 280-290.
- Koiwai, K., Kodera, T., Thawonsuwan, J., Kawase, M., Kondo, H., Hirono, I., 2018. A rapid method for simultaneously diagnosing four shrimp diseases using PCR-DNA chromatography method. Journal of Fish Diseases. 41: 395– 399. <https://doi.org/10.1111/jfd.12732>.
- Lee, M.S. and Shiau, S.-Y. 2004. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. Fish and Shellfish Immunology 16: 475-485.
- Lee, M.-H., and Shiau, S.-Y. 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. Fish and Shellfish Immunology. 12: 119-129.
- Möbius, K., Arias-Cartin, R., Breckau, D., Hännig, A.L., Riedmann, K., Biedendieck, R., Schröder, S., Becher, D., Magalon, A., Moser, J., Jahn, M. and Jahn, D. 2010. Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 107: 10436–10441.
- Nima, N., Duangsuwan, P., Pongtippatee, P., Kanjanasopa, D. and Withyachumnarkul, B. 2022. Types of cells in the hepatopancreas of the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* being infected by *Enterocytozoon hepatopenaei*. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 44: 97-102.

- Niu, J., Lin, H-Z., Jiang, S-G., Chen, X., Wu, K-C., Liu, Y-J., Wang, S. and Tian, L-X. 2013. Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine on growth performance, antioxidant defenses and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 372-375: 1-8.
- Nunes, E.T., Braga, A.A. and Camargo-Mathias, M.I. 2014. Histochemical study of the hepatopancreas in adult females of the pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* Latreille, 1817. *Acta Histochemica*. 116: 243-251.
- Ogura, S., Maruyama, K., Hagiya, Y., Sugiyama, Y., Tsuchiya, K., Takahashi, K., Abe, F., Tabata, K., Okuta, I., Nakajima, M., Tanaka, T. 2011. The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome c oxidase activity in mouse liver. *Research Notes*. 4: 66. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-66>
- Ota, U., Hara, T., Nakagawa, H., Tsuru, E., Tsuda, M., Kamiya, A., Kuroda, Y., Kitajima, Y., Koda, A., Ishizuka, M., Fukuhara, H., Inoue, K., Shuin, T., Nakajima, M., Tanaka, T. 2017. 5-aminolevulinic acid combined with ferrous ion reduces adiposity and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice via enhancing mitochondrial function. *Pharmacology and Toxicology* 18: 7. <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0108-3>
- Pedrosa-Gerasmio, I.R., Kondo, H. and Hirono, I. 2019. Dietary 5-aminolevulinic acid enhances adenosine triphosphate production, ecdysis and immune response in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture*. 50: 1131–1141.
- Pedrosa-Gerasmio, I.R., Nozaki, R., Kondo, H. and Hirono, I. 2020. Gut bacterial community profile in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* following 5-aminolevulinic acid supplementation. *Aquaculture Research*. 51:4075–4086.
- Pedrosa-Gerasmio, I.R., Tanaka, T., Sumi, A., Kondo, H. and Hirono, I. 2018. Effects of 5-aminolevulinic acid on gene expression, immunity, and ATP levels in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Marine Biotechnology*. 20: 829–843.
- Qiao, J., Du, Z., Zhang, Y., Du, H., Guo, L., Zhong, M., Cao, J. and Wang, X. 2011. Proteomic identification of the related immune-enhancing proteins in shrimp *Litopenaeus vannamei* stimulated with vitamin C and Chinese herbs. *Fish and Shellfish Immunology*. 31: 736-745.
- Saikeur, A., Choorit, W., Prasertsan, P., Kantachote, D. and Sasaki, K. 2009. Influence of precursors and inhibitor on the production of extracellular 5-aminolevulinic

- acid: and biomass by *Rhodospseudomonas palustris* KG31. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 73(5): 987-992.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172: 63-92.
- Sasaki, K., Watanbe, K., Tanaka, T. and Tanaka. 2002. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Microbial Biotechnology*. 58: 23–29.
- Sasaki, K., Watanbe, K., Tanaka, T., Hotta, Y. and Nagai, S. 1995. 5-aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11(3): 361-362.
- Sato, K., Matsushita, K., Takahashi, K., Aoki, M., Fuziwara, J., Miyanari, S. and Kamada, T. 2012. Dietary supplementation with 5-aminolevulinic acid modulates growth performance and inflammatory responses in broiler chickens. *Poultry Science*. 91:1582–9.
- Smith, V.J., Brown, J.H. and Hauton, C. 2003. Immuno-stimulation in crustacean: does it really protect against infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 15(1): 71-90.
- Soderhall, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*. 2: 3-23.
- Silva, M.A.S., Almeida Neto, M.E., Ramiro, B.O., Santos, I.T.F., Guerra, R.R. 2018. Histomorphologic characterization of the hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70(5): 1539–1546. doi:10.1590/1678-4162-10497
- Sriurairatana, S., Boonyawiwat, V., Gangnonngiw, W., Laosutthipong, C., Hiranchan, J. and Flegel, TW. 2014. White feces syndrome of shrimp arises from transformation, sloughing and aggregation of hepatopancreatic microvilli into vermiform bodies superficially resembling gregarines. *PLOS ONE* 2014. 9(6): e99170. Published online 2014 Jun 9. doi: 10.1371/journal.pone.0099170
- Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Longshaw, M., Feist, S.W., 2007. *Enterospora canceri* n. gen., n. sp., intranuclear within the hepatopancreatocytes of the European edible crab *Cancer pagurus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 75: 61– 72. <https://doi.org/10.3354/dao075061>.
- Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Dubuffet, A., Chambers, E., Stone, D.M., 2011. *Hepatospora eriocheir* (Wang and Chen, 2007) gen. et comb. nov. infecting invasive Chinese

- mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*. 108: 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.07.008>.
- Supamattaya, K., Kiriratnikoma, S., Boonyaratpalin, M. and Borowitzka, L. 2005. Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. 248: 207-216.
- Tang, KF., Han, JE., Aranguren, LF., White-Noble, B., Schmidt, MM., Piamsomboon, P., Risdiana, E., Hanggono, B. 2016. Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*. 140: 1-7.
- Tangprasittipap, A., Srisala, J., Chouwdee, S., Somboon, M., Chuchird, N., Limsuwan, C., Srisuvan, T., Flegel, T.W. and Sritunyalucksana, K. 2013. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Veterinary Research* 2013. 9:139.
- Tassanakajonet, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P. and Tang, S. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish and Shellfish Immunology*. 34: 954–967.
- Thawatchai Chaijarasphonga, b., Natthinee Munkongwongsiric, Grant, D., Stentiford, e., Diva, J., Aldama-Canoa, c., Kwanta Thansac, Timothy, W., Flegela, f., Kallaya Sritunyalucksana, and Ornuma Itsathitphaisarn. 2020. The shrimp microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) : Biology, pathology, diagnostics and control. *Journal of Invertebrate Pathology*. (ออนไลน์: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107458>)
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyalucksana, K. and Withyachumnarnkul, B. 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102: 21-29.
- Tseng, D.Y., Chen, Y.N., Liu, KF., Kou, GH., Lo, CF., Kuo, CM. 2002. Hepatopancreas and ovary are sites of vitellogenin synthesis as determined from partial cDNA

- encoding of vitellogenin in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Invertebrate Reproduction and Development* .42: 137-143.
- Vogt, G. 2019. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of Morphology*. 280: 1405-1444.
- Vossbrinck, C. R. and Debrunner-Vossbrinck B. A. 2005. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitologica*. 52: 131-142.
- Wang, S. H. and Chen, J.-C. 2005. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Immunology*. 19: 191-204.
- Wang, J.P., Jung, J.H. and Kim, I.H. 2011. Effects of dietary supplementation with delta-aminolevulinic acid on growth performance, hematological status, and immune responses of weanling pigs. *Journal Livestock Science*. 140: 131-135.
- Wang, X.W., Zhang, X.W., Xu, W.T., Zhao, X.F. and Wang, J.X. 2009. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 1039–1047.
- Wang, X.W. and Wang, J.X. 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish and Shellfish Immunology*. 34: 981-989.
- Wongprasert, K., Rudtanatip, T. and Praiboon, J. 2014. Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*. 36: 52-60
- Wu, Y., Liao, W.B., Dawuda, M.M., Hu, L.L. and Yu, J.H. 2019. 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review. *Journal of Plant Growth Regulation*. 87: 357–74.
- Wu, C.-C., Chang, Y.-P., Wang, J.-J., Liu, C.-H., Wong, S.-L., Jiang, C.-M. and Hsieh, S.-L. 2015. Dietary administration of *Gynura bicolor* (Roxb. Willd.) DC water extract enhance immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 42: 25-33.
- Yang, S., Huang, H., Wang, F., Aweya, J.J., Zheng, Z. and Zhang, Y. 2018. Prediction and characterization of a novel hemocyanin-derived antimicrobial peptide from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Amino Acids* (2018). 50:995–1005.

- Yang, Q-H., Tan, B-P., Dong, X-H., Chi, S-Y. and Liu, G-Y. 2015. Effect of different levels of *Yucca schidigera* extract on the growth and nonspecific immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and on culture water quality. *Aquaculture*. 439: 39-44.
- Zhang, J., Kang, Z., Chen, J. and Du, G. 2015. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 5: 8584.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารเคมี

1.1 การเตรียมสารละลาย Davidson's fixative

95 % Ethanol	331 มิลลิลิตร
37 % Formalin	221 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	115 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	335 มิลลิลิตร

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้ เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 335 มิลลิลิตร ลงในขวดดูเรน เต็ม Ethanol ปริมาตร 331 มิลลิลิตร Formalin ปริมาตร 221 มิลลิลิตร ตามด้วย Glacial acetic acid ปริมาตร 115 ml

1.2 การเตรียมสารละลาย 5X Tris-borate-EDTA Buffer

Tris-base	54 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
0.5 M EDTA	20 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้ เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 335 มิลลิลิตร ลงในขวดดูเรน เต็ม ชั่ง Tris-base 54 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร เต็ม Boric acid 27.5 กรัม ละลายจนเข้ากัน และเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1.5 M ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง เก็บรักษาไว้โดยวางที่อุณหภูมิห้อง

1.3 การเตรียมสารละลาย 1X Tris-borate-EDTA Buffer

5X TBE Buffer	200 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้ เตรียม 5X TBE Buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง เติลงในขวดดูเรนและเก็บรักษาไว้โดยวางที่อุณหภูมิห้อง

1.4 การเตรียม 0.8 % Agarose

Agarose	0.8 กรัม
1X TBE Buffer	100 มิลลิลิตร

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้ ชั่ง Agarose ปริมาตร 0.8 กรัม ละลายด้วย 1X TBE Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลาย Agarose ด้วยความร้อน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม SYBR Safe เทสารละลาย Agarose ลงสู่ Gel box หรือ Gel tray และเสียบหัว (Comb) และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25-30 นาที ก่อนย้ายลง Gel chamber

1.5 การเตรียม 1.5 % Agarose

Agarose	1.5 กรัม
1X TBE Buffer	100 มิลลิลิตร

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้ ชั่ง Agarose ปริมาตร 1.5 กรัม ละลายด้วย 1X TBE Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลาย Agarose ด้วยความร้อน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม SYBR Safe เทสารละลาย Agarose ลงสู่ Gel box หรือ Gel tray และเสียบหัว (Comb) และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25-30 นาที ก่อนย้ายลง Gel chamber

1.6 การเตรียม 6X loading buffer

Bromphenol blue	0.025 กรัม
Xylene cyanol FF	0.025 กรัม
Glycerol	3 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	7 มิลลิลิตร

มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้ ชั่ง Bromphenol blue ปริมาตร 0.025 กรัม Xylene cyanol FF ปริมาตร 0.025 กรัม และเติม Glycerol ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมสารละลาย Vortex Mixer เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวกที่ 2 ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1 นำหนักตัวสุดท้ายของกุ้ง *L. vannamei* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 21 วัน

Shrimp no.	Body weight (g)			
	0 ppm	15 ppm	30 ppm	60 ppm
1	2.40	2.46	1.96	2.27
2	2.34	2.09	2.98	2.10
3	1.51	1.16	2.06	1.89
4	0.82	1.36	1.80	2.18
5	1.74	2.38	2.05	1.88
6	2.00	3.00	2.71	2.19
7	1.25	0.77	2.14	2.44
8	1.44	1.34	1.66	2.57
9	2.12	1.71	0.99	2.44
10	2.17	0.96	2.56	2.12
11	2.54	2.86	1.48	2.00
12	2.31	2.84	2.45	1.55
13	2.17	2.16	1.51	1.63
14	2.15	2.47	0.71	1.81
15	2.23	1.39	2.09	1.35
16	1.66	2.24	1.13	1.50
17	0.39	3.00	2.82	1.32
18	1.80	2.59	1.60	0.74
19	2.94	2.09	0.59	1.41
20	2.00		0.51	1.31
21	2.81		3.04	2.39
22			1.31	1.67
23			2.34	0.79
24			1.56	3.54
25			1.59	2.11
26				2.10
27				1.89
28				1.30
29				0.59
Means	1.92	2.00	1.86	1.82
SD	0.45	0.46	0.28	0.35
N	21	19	25	29

ตารางภาคผนวกที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของกุ้ง *L. vannamei* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 21 วัน

Bucket No.	Survival Rate (%)			
	0 ppm	15 ppm	30 ppm	60 ppm
1	50	67	67	100
2	83	50	83	100
3	100	50	83	100
4	50	83	100	100
5	67	67	83	83
Means	70.00	63.00	83.00	97.00
SD	21.73	13.94	11.79	7.45
N	5	5	5	5

ตารางภาคผนวกที่ 3 เปอร์เซ็นต์ atrophic tubule ของตับกุ้ง *L. vannamei* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 21 วัน

Shrimp no.	Atrophic Tubule (%)			
	0 ppm	15 ppm	30 ppm	60 ppm
1	57.36	38.78	8.77	0.00
	59.65	46.07	6.86	3.66
	52.43	52.48	7.69	0.00
2	2.35	19.53	5.70	1.06
	1.77	12.34	6.26	5.29
	4.36	10.38	8.04	8.04
Means	29.65	29.93	7.22	3.01
SD	29.49	18.15	1.15	3.25
N	6	6	6	6

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของ vacuole ภายใน B-cell ตับกุ้ง *L. vannamei* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม 5-ALA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 21 วัน

Sample	Vacuolar Area Of B-cell (mm ²)							
	0 ppm		15 ppm		30 ppm		60 ppm	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Area								
1	195.29	276.72	316.90	306.71	217.37	457.89	417.68	389.04
	257.62	301.11	288.92	300.91	398.89	302.73	361.76	351.48
	174.24	175.22	286.98	331.00	213.90	295.31	383.91	460.16
	258.73	353.64	322.44	230.05	299.46	351.55	322.40	332.98
	242.11	152.90	348.48	225.19	245.12	493.69	369.22	317.95
	210.80	222.32	347.37	208.69	298.30	525.16	374.76	342.80
	179.78	229.82	276.18	263.05	183.84	276.69	385.84	444.52
	153.19	245.20	255.13	387.27	211.59	414.49	363.97	365.35
	238.78	179.17	326.87	383.41	245.12	346.13	445.14	462.47
	219.39	218.56	268.98	261.11	213.90	316.10	396.92	456.67
2	135.46	154.78	263.16	178.60	352.64	311.58	446.24	317.95
	145.15	302.05	229.36	173.75	497.17	368.91	352.32	443.97
	233.30	211.06	290.58	109.69	311.02	235.45	373.65	487.90
	215.51	180.10	253.74	160.16	137.59	411.23	558.43	382.69
	185.04	230.76	329.64	153.37	405.83	344.87	309.40	502.93
	182.83	216.69	225.76	131.04	208.12	312.49	318.26	453.20
	217.73	217.63	254.85	198.02	307.55	240.88	381.70	365.35
	220.78	312.37	249.03	245.58	422.01	406.71	321.58	387.32
	221.05	187.61	234.63	193.16	233.55	396.04	430.45	434.72
	237.67	151.96	310.25	123.27	283.27	412.87	445.38	317.95

Sample	Vacuolar Area Of B-cell (mm ²)							
	0 ppm		15 ppm		30 ppm		60 ppm	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Area								
3	164.10	196.57	267.41	255.52	390.06	449.05	396.92	350.52
	224.81	160.59	270.48	234.71	283.68	459.54	332.73	365.95
	108.35	190.91	220.69	104.06	478.14	513.81	451.56	298.77
	211.32	118.27	218.43	174.59	360.32	322.75	419.15	388.58
	221.50	248.48	334.99	298.30	319.14	433.24	390.86	336.12
	220.37	272.18	267.81	183.84	546.77	474.95	395.38	347.43
	240.74	343.97	278.41	273.45	464.41	303.32	367.81	482.11
	146.40	282.12	215.03	313.33	426.66	359.45	359.89	315.75
	210.19	304.91	212.77	334.17	471.28	358.37	375.74	322.54
	138.48	257.16	195.79	275.18	307.70	299.70	334.99	340.33
4	218.49	342.88	208.15	293.68	350.02	299.76	301.04	327.88
	229.02	228.95	190.13	272.32	307.70	425.30	492.30	349.39
	193.93	312.50	279.54	307.01	399.21	309.80	329.34	362.15
	188.59	133.46	244.46	286.17	285.31	527.85	438.30	329.33
	229.43	119.36	264.83	266.52	362.61	392.92	362.16	366.36
	226.03	172.53	228.61	336.46	263.09	330.31	351.97	380.25
	190.54	113.93	275.74	287.33	435.82	277.42	307.11	427.47
	227.89	124.78	183.34	146.84	431.24	318.05	358.04	444.45
	216.98	182.29	240.65	275.79	480.43	483.59	354.64	394.24
	135.81	155.17	224.81	355.54	350.99	345.42	446.72	290.85

Sample	Vacuolar Area Of B-cell (mm ²)							
	0 ppm		15 ppm		30 ppm		60 ppm	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Area								
5	195.85	340.65	163.62	306.48	525.18	283.31	353.99	319.13
	158.17	210.50	276.99	247.92	274.35	346.35	472.53	358.66
	209.75	193.53	220.89	249.04	350.49	308.28	312.64	306.81
	208.32	221.82	192.18	268.75	343.78	298.20	333.14	352.72
	170.64	166.37	165.16	296.74	269.09	254.19	361.08	384.42
	160.39	133.55	213.22	239.64	283.65	361.69	387.06	499.41
	175.35	179.95	235.28	209.40	258.67	378.49	485.17	403.89
	217.54	290.86	341.27	290.03	357.21	258.67	358.71	301.22
	215.40	131.28	252.45	156.77	402.00	340.42	333.90	313.53
	164.82	193.53	206.87	154.53	221.72	333.70	331.54	338.17
6	218.70	250.11	192.84	307.94	295.96	437.50	453.63	356.43
	200.83	312.36	254.79	252.40	378.49	444.56	447.73	360.90
	205.26	452.69	336.60	131.02	283.31	372.89	470.17	325.07
	184.49	312.36	196.20	249.04	349.37	382.97	367.40	354.53
	192.80	255.77	183.20	179.17	248.59	266.51	420.56	352.29
	173.13	199.19	230.10	156.77	250.05	282.19	232.01	360.90
	166.21	329.34	248.14	152.29	313.54	327.32	445.36	382.52
	131.86	331.60	296.86	144.45	291.48	264.61	365.03	374.68
	205.08	477.59	162.53	287.79	314.66	369.53	347.31	373.22
	164.27	288.59	219.07	286.67	289.24	274.35	247.67	303.80

Sample	Vacuolar Area Of B-cell (mm ²)							
	0 ppm		15 ppm		30 ppm		60 ppm	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Area								
7	195.43	272.11	278.83	254.58	282.93	325.08	425.34	360.31
	200.25	125.42	181.62	287.09	203.71	303.46	357.85	380.24
	138.99	141.09	273.35	326.65	242.19	316.46	202.46	427.80
	225.62	250.83	142.96	325.48	289.72	329.22	322.39	468.97
	215.59	188.13	361.53	190.64	271.62	363.15	349.84	399.69
	131.19	133.26	311.91	240.63	230.87	416.56	325.99	374.04
	217.74	241.88	129.96	356.87	520.60	286.67	408.35	327.62
	201.36	203.80	224.48	215.05	354.23	245.23	293.97	394.45
	222.40	225.08	379.25	277.82	156.18	271.33	439.06	323.05
	127.40	268.75	256.38	180.18	126.75	250.83	413.90	308.84
8	183.54	178.05	207.61	139.49	220.69	745.78	260.80	390.05
	123.49	164.61	314.70	233.65	415.35	318.70	314.56	386.62
	205.13	201.56	293.43	396.39	385.92	325.08	243.64	313.41
	216.09	349.37	152.41	138.33	221.82	327.66	299.69	331.06
	122.43	215.00	339.08	174.37	210.50	288.13	295.60	359.17
	231.69	247.47	288.28	233.62	205.98	237.40	269.95	325.99
	178.22	202.68	342.63	302.24	323.68	315.55	371.58	340.21
	219.19	273.23	219.42	240.57	150.52	325.08	275.67	364.23
	139.11	246.35	152.41	267.24	209.37	334.38	278.44	375.18
	208.05	266.51	281.19	289.42	160.71	259.01	286.45	383.67

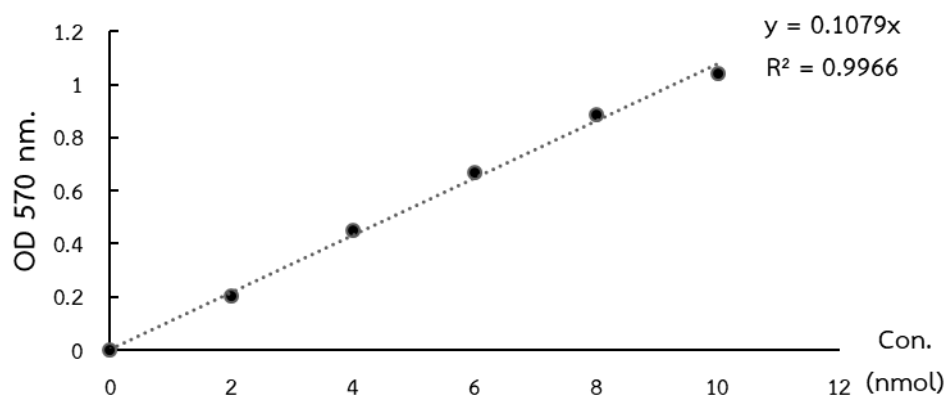
Sample	Vacuolar Area Of B-cell (mm ²)							
	0 ppm		15 ppm		30 ppm		60 ppm	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Area								
9	214.03	305.41	311.95	297.24	411.27	246.72	477.32	366.52
	207.39	232.33	310.10	269.35	164.08	307.83	381.95	476.51
	256.65	293.41	280.67	243.32	321.67	345.18	419.75	406.07
	215.84	195.24	270.08	150.52	369.17	675.65	245.32	382.54
	173.96	178.88	287.14	222.95	296.85	245.59	319.75	394.46
	127.25	165.79	383.66	281.80	324.91	349.71	358.32	340.87
	150.47	342.49	279.54	301.77	573.18	428.11	390.22	487.95
	159.06	171.25	151.65	306.29	482.51	484.38	385.16	311.62
	131.80	268.32	331.19	276.87	592.61	314.62	430.06	393.31
	124.12	151.61	224.08	291.58	277.42	474.20	319.00	439.25
10	206.79	214.88	230.87	270.08	237.48	272.75	401.70	248.22
	164.43	237.78	267.09	153.92	220.21	244.46	291.40	334.49
	211.81	134.16	205.98	157.31	480.35	243.32	396.88	342.02
	171.95	436.30	303.31	268.22	322.75	461.75	333.51	300.84
	204.81	397.03	300.63	296.11	370.25	333.86	331.57	308.18
	216.98	189.79	312.36	240.24	389.68	323.68	475.28	347.08
	219.33	173.43	333.45	319.87	426.38	331.60	381.62	467.84
	154.77	286.87	244.05	253.10	270.94	346.31	365.08	331.72
	198.80	387.21	332.73	291.99	184.58	336.13	441.54	420.46
	197.72	123.25	322.14	284.07	390.76	388.19	429.21	371.10
Means	210.54		251.40		342.07		368.67	
SD	81.67		61.56		99.33		54.43	
N	400		400		400		400	

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่า relative density ของความเข้มข้นของแถบ PCR product จากเจลอิลีกโตรโฟรีซิส

Sample	Relative density			
	0 ppm	15 ppm	30 ppm	60 ppm
1	0.681249	0.946331	1.081393	0.769232
2	0.664649	2.04341	0.891128	1.376034
3	0.932832	1.114719	1.409829	1.30388
4	0.422654	1.048659	0.791692	1.061171
5	0.306025	0.968537	0.802298	1.757884
6	0.198002	0.921812	1.105489	1.133201
7	0.295554	0.919084	1.02762	0.84039
8		1.263427	0.851698	0.935104
9			0.771525	0.875969
10			0.835029	0.99866
11				0.713835
Means	0.5	1.2	1.0	1.1
SD	0.3	0.4	0.2	0.3
N	7	8	10	11

ตารางภาคผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐาน ATP

Standard no.	End amount ATP (nmol/well)	OD 570 nm.
1	0	0
2	2	0.20
3	4	0.45
4	6	0.67
5	8	0.89
6	10	1.04



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐาน ATP

สูตรการคำนวณความเข้มข้น ATP ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

$$Y = 0.1079X$$

$$OD. = 0.1079X$$

$$X \text{ (nmol)} = \frac{OD.}{0.1079}$$

ตารางภาคผนวกที่ 7 ความเข้มข้นของ ATP ในตับกุ้ง *L. vannamei* ที่ติดเชื้อ EHP

Sample	ATP Level (nmol)			
	0 ppm	15 ppm	30 ppm	60 ppm
1	0.14	0.23	0.22	0.23
2	0.12	0.16	0.17	0.43
3	0.10	0.16	0.31	0.30
4	0.09	0.16	0.29	0.16
5	0.16	0.26	0.19	0.15
Means	0.12	0.19	0.24	0.25
SD	0.03	0.05	0.06	0.12
N	5	5	5	5

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวสุธาทิพย์ คงปล้อง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6340620102

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2562

ทุนการศึกษา

ทุนสนับสนุนจากสาขาความเป็นเลิศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างยั่งยืน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Kongplong S., Kanjanasopa D., Pongtippatee P., Vanichviriyakit R., Withyachumnarnkul B. 2023. 5-Aminolaevulinic acid reduced the mortality of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with *Enterocytozoon hepatopenaei*. *Aquaculture*. 568(2023): 739322.



5-Aminolaevulinic acid reduced the mortality of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with *Enterocytozoon hepatopenaei*

Suthathip Kongplong^a, Duangkhaetita Kanjanasopa^a, Pattira Pongtippatee^b,
Rapeepun Vanichviriyakit^c, Boonsirm Withyachumnarnkul^{b,d,*}

^a Agricultural Science and Technology Program, Faculty of Innovative Agriculture and Fishery Establishment Project, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani 84000, Thailand

^b Fishery Resources Program, Faculty of Innovative Agriculture and Fishery Establishment Project, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, 84000, Thailand

^c Department of Anatomy and Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Bangkok 10400, Thailand

^d AquaAcademy Farm, Tha Chana, Surat Thani 84170, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

5-ALA
Hepatopancreatic microsporidiosis
Slow growth
Chronic mortality
Enterocytozoon hepatopenaei

ABSTRACT

Hepatopancreatic microsporidiosis, the shrimp disease caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection, has been widely spread in farmed *Litopenaeus vannamei* in Thailand. The symptoms include decreased feeding, muscle waste, slow growth, and chronic mortality. Since 5-aminolaevulinic acid (5-ALA), a non-protein amino acid, has been known to enhance ATP production in the cell through the increased formation of hemoproteins in the electron transport complex of mitochondria, it was hypothesized that providing 5-ALA to EHP-infected shrimp might reduce the mortality caused by the infection. Naturally EHP-infected *L. vannamei* were randomly sampled from a commercial shrimp pond that showed signs of hepatopancreatic microsporidiosis. The shrimp samples were reared under 30-ppt seawater in 40-L plastic tanks, divided into four groups; each receiving commercial pellets supplemented with different doses of 5-ALA: 0 (control), 15, 30, and 60 ppm. After 21 days of the experiment, it was found that the shrimp receiving 5-ALA at 60 ppm survived at a rate significantly ($p < 0.05$) higher than that of other groups, and had a significant increase in biomass, compared with that of the control group. Histology of the hepatopancreas of the 60-ppm group revealed significantly ($p < 0.01$) less percentage of atrophic tubules and larger areas of the vacuoles of the B-cells, suggesting improved hepatopancreatic functions. The levels of the EHP load in the hepatopancreas as revealed by semi-quantitative PCR were increasing in a dose-related manner of 5-ALA supplement. Histology of the hepatopancreas also revealed the presence of EHP. The ATP levels in the hepatopancreas of the 30- and 60-ppm groups were significantly ($p < 0.01$) higher than that of the control group. Further tests are required in commercial farms to find out if the 5-ALA supplement is beneficial to tackle the problem of hepatopancreatic microsporidiosis at the industrial level.

1. Introduction

Since 2012, the production of farmed *Litopenaeus vannamei* in Thailand has decreased drastically due to three infectious diseases: white-spot disease (WSD), acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), and hepatopancreatic microsporidiosis (DOF, 2021). The causative agents of WSD, AHPND, and hepatopancreatic microsporidiosis are white-spot syndrome virus (WSSV), toxin-producing *Vibrio parahaemolyticus*, and *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), respectively (Flegel, 2012; Chaijarasphong et al., 2021). EHP is the intracellular fungus-like pathogen of the hepatopancreatic epithelial

cells; in Thailand, the pathogen was firstly reported in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Chayaburakul et al., 2004; Tourtip et al., 2009) and later in *L. vannamei* (Suebsing et al., 2013). Ever since, EHP spores have been detected in the farm environment and public waterways (Pattarayingsakul et al., 2022), resulting in a wide spread of EHP infection of farmed *L. vannamei*. At present (2022), the prevalence of EHP-positive detection by polymerase chain reaction (PCR) method in farmed shrimp was >80% (Withyachumnarnkul, unpublished). The infected shrimp manifest a reduction in feed intake and slow growth, although the association between the slow growth and EHP load in the hepatopancreas of the infected shrimp is still inconclusive (Rajendran

* Corresponding author at: AquaAcademy Farm, Tha Chana, Surat Thani 84170, Thailand.
E-mail address: wboonsirm@yahoo.com (B. Withyachumnarnkul).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739322>

Received 23 September 2022; Received in revised form 25 January 2023; Accepted 31 January 2023

Available online 4 February 2023

0044-8486/© 2023 Published by Elsevier B.V.

et al., 2016). The EHP infection is associated with the white-feces disease, the phenomenon observed in the shrimp rearing pond as the shrimp pass out white feces loaded with EHP spores floating on the water surface (Tang et al., 2016). Shrimp mortality of 5–100 kg daily (from 0.5–1.0 million shrimp in a one-hectare pond) was observed in the affected ponds, and most of the dead shrimp had no white feces but rather soft bodies resulting from incomplete molting (Withyachumnarnkul, unpublished). It was estimated that the economic loss from EHP infection was more than that being caused by WSD outbreaks (Patil et al., 2021).

Despite the use of chemical treatments to eliminate EHP from the supply water of the shrimp pond as previously recommended (Aldama-Cano et al., 2018), the problem still exists. It was later found that shrimp seeds obtained from hatcheries, at times, were not EHP-free as indicated by PCR tests from the hatcheries (Wan Sajiri et al., 2021). Moreover, the hepatopancreas and ovaries of broodstock from hatcheries were tested EHP-positive (Withyachumnarnkul, unpublished).

Histologically, the hepatopancreas of the EHP-infected shrimp features various degrees of atrophic hepatopancreatic tubules composed of a single layer of thin epithelial cells (Nima et al., 2022). In other sections of the tubules where different functional cell types could be identified, EHP of various stages (plasmodium, sporoblast, sporocyst, and spores) were localized in the cytoplasm of the cells (Nima et al., 2022). As EHP does not possess mitochondria, the pathogen cannot produce ATP and thus has to depend on the host ATP for its metabolism (Corradi and Keeling, 2009). This could result in the host cells being short of ATP for their metabolism. 5-Aminolaevulinic acid (5-ALA), the endogenous non-protein amino acid, functions as a heme-forming molecule; eight molecules of 5-ALA form a tetrapyrrole heme structure (Shemin and Russell, 1953). Heme is an integral part of several types of hemoproteins; the notable ones are hemoglobin and those in the electron transport chain (Möbius et al., 2010). Besides, several proteins involved in the molting process and host defense are hemoproteins (Reinking et al., 2005; Tasanakajon et al., 2013). Therefore, 5-ALA plays an important role to increase the production of ATP, host defense, and the molting process of the shrimp, which might help EHP-infected shrimp to reduce the morbidity and mortality caused by the pathogen.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

All the animal experiments in this study were performed following the guidelines of the Animal Ethics Committee for laboratory animals at Prince of Songkla University, Thailand. The experimental animals were *L. vannamei* juveniles from a commercial shrimp pond. The shrimp in the pond had been pre-tested by PCR for EHP infection, which revealed that approximately 90% of them were infected. The shrimp, 120 individuals, were randomly sampled from the pond at 15 days of culture (DOC15), at which time they showed no clinical manifestations of the disease. They were then stocked in twenty 40-L tanks, 6 individuals per tank, and divided into 4 groups, with 5 replicates/group. Each tank was divided with the net (16 mesh) into 6 equal compartments to prevent cannibalism. Each group received 5-ALA (Neopharma Japan Co., Ltd.) at 0 (control), 15, 30, and 60 ppm/kg pellets, for 21 days. The application was performed by top-dressing the shrimp pellets (CPF, Thailand) with distilled water containing 5-ALA at the designated concentrations. After top-dressing, the pellets were coated with squid oil, 6 mL/kg pellets, to prevent leaching of 5-ALA. The shrimp were fed three times daily (08.00, 13.00, and 17.00 h) at approximately 4% biomass. Water quality in the tanks was monitored to ensure optimum conditions for shrimp rearing [Total ammonia nitrogen (TAN), <0.5 ppm; nitrite, <0.5 ppm, dissolved oxygen (DO), 4–5 ppm; alkalinity, 130–150 ppm; pH, 8.0–8.5; and salinity, 28–30 ppt]. Water exchange at 70% was performed daily with chlorinated (30% active ingredient of 65% calcium hypochlorite) sand-filtered seawater at 08.00 h and shrimp mortality was recorded at

that time; dead shrimp was discarded.

The shrimp body weight (BW) was determined individually at the beginning and the end of the experiment, at which time the survivors were cold-anesthetized in ice, individually weighed, and their hepatopancreas isolated. The average survival rate (SR) of each group was calculated from the average SR of the 5 replicates, and the average BW of each group was calculated from the average BW of each replicate. The biomass of the shrimp, which was the average BW x the number of survived shrimp, was determined at the beginning (initial) and the end (final) of the experiment for each replicate. The ratio of the final/initial biomass of each replicate was calculated as the fold of biomass increase. The values of the 5 replicates in each group were then averaged to represent the fold of biomass increase of that particular group.

The hepatopancreas was immediately divided into three parts, each being placed into one of the three microtubes containing either 1-mL Davidson's fixative (for histology), 1-mL 95% ethanol (for PCR), or nothing (for ATP determination). The tubes containing nothing were placed in a foam box containing dried ice for immediate freezing of the tissue, which was thereafter stored at -80°C . For PCR, the tissue was preserved by being ground in the microtube with a small glass rod. In each test, 8–11 tissue samples were employed per group.

2.2. Histology

The Davidson-fixed samples were routinely processed through the standard paraffin sectioning method by being dehydrated with ethanol, infiltrated and embedded in paraffin, sectioned at 5 μm thickness, and stained with Hematoxylin and Phloxine B (H&P) according to the method described (Zhao et al., 2020). The sections were examined under light microscopy (LM); spores and other stages of EHP were identified by the red staining of Phloxine B.

The histological features of EHP-infected hepatopancreas were composed of atrophic and normal hepatopancreatic tubules (Chaijarasphong et al., 2021). The atrophic tubule was identified by a single layer of low cuboidal epithelium and a large lumen, while the normal epithelium was composed of thick epithelium and a small, often star-shaped, lumen. Different cell types of the hepatopancreatic epithelium could be identified in the normal epithelium (Nima et al., 2022). Under low magnification (10 \times), cross sections of the hepatopancreatic tubules were examined, and the atrophic tubules was counted from a total of 200 cross sections of the tubules from individual shrimp.

Under high magnification (100 \times), the area of the B-cell vacuole was determined using the ImageJ program. The average area of the B-cell vacuoles in each sample was calculated from the vacuole areas of 200 B-cells.

2.3. PCR determination of the hepatopancreas

2.3.1. DNA extraction and purification

DNA extraction was performed using the EZNA[®] Tissue DNA Kit protocol (Omega, BIO-TEK, Norcross, GA). The ground hepatopancreatic tissue was transferred from 95% ethanol to 200 μL TL buffer. Cell lysis was proceeded by adding 25 μL of Proteinase K solution to the tissue; the mixture was mixed vigorously and incubated at 55°C for 1 h. Eight μL of RNase A (25 mg/mL) was added to eliminate RNA, followed by 2-min incubation at room temperature. Cell debris was precipitated by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 10 min at 4°C , and the supernatant was transferred to a fresh tube, in which 220 μL BL buffer was added, followed by 10-min incubation at 70°C . Then, 220 μL of cool absolute ethanol was added and the mixture was transferred into the HiBind[®] DNA Mini Column, which was inserted into a 2-mL collection tube. The column was centrifuged at 10,000 $\times g$ for 1 min to discard the filtrate, flushed with 500 μL of HBC buffer, and transferred into a new 2-mL collection tube. The washing step was performed twice by adding 700 μL of DNA wash buffer into the column and the filtrate was removed by centrifugation at 10,000 $\times g$ for 30 s. The extracted DNA was eluted by

transferring the column to a fresh tube, and 100 μ L of elution buffer was added, and the column was incubated at room temperature for 2 min, before being centrifuged at 10,000 $\times g$ for 1 min. The eluted DNA was determined for its concentration using a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) and stored at -20°C until use.

2.3.2. PCR procedure

The reaction mixture (25 μ L) was composed of a 50 ng DNA template, 5 μ L of 5 \times HOT FIREPOL[®] Blend DNA Polymerase, 0.2 μ M of primers specific for SWP of EHP (Jaroenlak et al., 2016), and deionized distilled water. The first-step reaction employing primers SWP_1F and SWP_1R (Table 1) was performed according to the following conditions: 5-min initial denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$; 30-s denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$; 30-s annealing at 58 $^{\circ}\text{C}$; 45-s extension at 68 $^{\circ}\text{C}$. The reactions were performed for 30 cycles, with a final 5-min extension at 68 $^{\circ}\text{C}$. The expected PCR product was 514 bp. In the nested step, the template consisted of 1 μ L of the final reaction solution from the first step. The primers employed were SWP_2F and SWP_2R (Table 1), and the conditions were as follows: 5-min initial denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$; 30-s denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$; 30-s annealing at 64 $^{\circ}\text{C}$; 20-s extension at 68 $^{\circ}\text{C}$. The reactions were performed for 20 cycles, with a final 5-min extension at 68 $^{\circ}\text{C}$. The expected PCR product was 148 bp. An internal control reaction was performed by using specific primers of the β -actin gene (Table 1) in a 25- μ L reaction under the same condition as in the first-step reaction. The expected PCR product was 401 bp. The amplicons were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis with SYBR safe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and their sizes were estimated using a 100-bp DNA ladder marker. The PCR bands were visualized under a UV illuminator and semi-quantitated by standardizing the density of the EHP nested-PCR band with the β -actin band, using the program ImageJ.

2.4. ATP determination

The levels of ATP in the shrimp hepatopancreas were determined using an ATP Colorimetric Assay Kit (Abcam[®], Cambridge, UK) following the manufacturer's protocol. The hepatopancreatic tissue (10 mg) kept at -80°C was washed in cold 1 \times PBS, and then homogenized in 100 μ L ice-cold 2 N perchloric acid, which was the deproteinization step. The suspension was kept on ice for 45 min and centrifuged at 13,000 $\times g$ for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The supernatant was transferred to a fresh tube and diluted to 500 μ L with the ATP assay buffer. Excess perchloric acid in the supernatant was eliminated by adding 50–100 μ L of ice-cold 2 M KOH to neutralize the sample. Then, the mixture was centrifuged at 13,000 $\times g$ for 15 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ to remove precipitated perchloric acid and the supernatant was collected in a new tube. ATP standard curve was prepared at the range of 0–10 nmol. Fifty μ L of samples and sample background control were then loaded in a 96-well plate with a clear flat bottom. Adenosine triphosphate reaction and background control mix were added with the corresponding sample and sample background controls. The plate was incubated for 30 min, protected from light, and optical densitometry was measured at 570 nm by microplate spectrophotometer (SPECTROstar[®] Nano, BMG LABTECH, Aylesbury, UK).

Table 1
PCR primers used in this study.

Primer name	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
First-step		
SWP_1F	TTG-CAG-AGT-GTT-GTT-AAG-GGT-TT	514
SWP_1R	CAC-GAT-GTG-TCT-TTG-CAA-TTT-TC	
Nested-step		
SWP_2F	TTG-GGG-GCA-CAA-TTC-TCA-AAC-A	148
SWP_2R	GCT-GTT-TGT-CTC-CAA-CTG-TAT-TTG-A	
β-Actin		
Actin_F	CCT-CGC-TGG-AGA-AGT-CCT-AC	401
Actin_R	TGG-TCC-AGA-CTC-GTC-GTA-CTC	

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software (Version 26), and a significant difference among groups was indicated when $p < 0.05$ as determined by one-way ANOVA.

3. Results

3.1. Growth, survival, and biomass increase

The average initial and final BWs were comparable in all groups (Fig. 1A). The survival rates of the groups, however, were different (Fig. 1B). The 30-ppm group survived at 83%, which was significantly higher ($p < 0.05$) than that of the 15-ppm group. The 60-ppm group

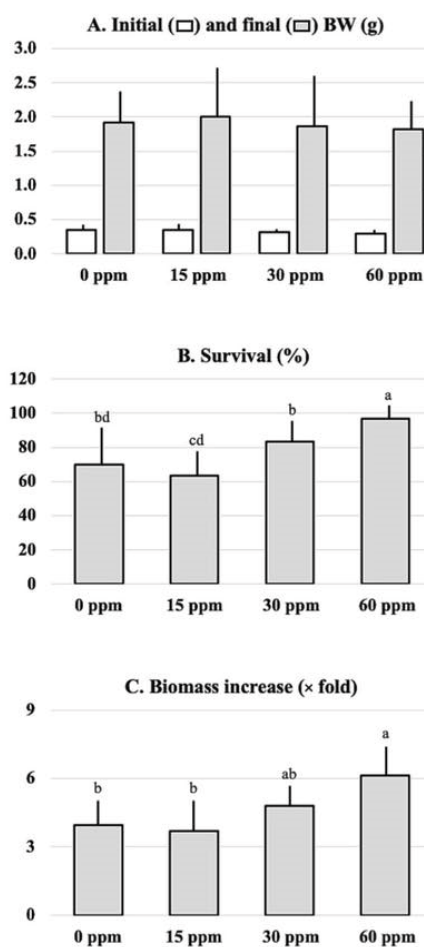


Fig. 1. The initial and final body weights (A), the survival rate (B), and the biomass increase (C) of EHP-infected *L. vannamei* provided with different doses of 5-ALA. Different superscripts indicate statistically significant differences.

survived at 97%, significantly higher than all other groups ($p < 0.05$, compared with the control and 30-ppm groups; $p < 0.01$, compared with the 15-ppm group). The biomass increase of the 60-ppm group was significantly higher ($p < 0.05$) than that of the 0- and 15-ppm groups. When translated into the increase in the production, the 60-ppm group was 1.6× fold of that of the control group.

3.2. The percentage of atrophic hepatopancreatic epithelium and the area of B-cell vacuole

Histology of the shrimp hepatopancreas revealed the existence of hepatopancreatic tubules with low cuboidal epithelium and large lumen (atrophic tubules), those being composed of several cell types and rich in B-cells and small “star-shaped lumen” (normal tubules), and those displaying between these two extremes (Fig. 2A). The epithelium of the distal tubules of the hepatopancreas was composed of only E-cells (Fig. 2C).

The percentage of the atrophic tubules of the control and 15-ppm groups was approximately 30%, with high variation among individual shrimp (Fig. 3A). The 30- and 60-ppm groups had the percentage of 7 and 3%, respectively, both values were significantly lower ($p < 0.01$) than that of the first two groups.

The average areas of the B-cell vacuoles of the 30- and 60-ppm groups ($320\text{--}370\ \mu\text{m}^2$) were significantly ($p < 0.05$) larger than those of the control and 15-ppm groups ($200\text{--}240\ \mu\text{m}^2$) (Fig. 3B). No significant difference was detected between the control and 15-ppm groups and between the 30- and 60-ppm groups.

3.3. EHP load

The hepatopancreas of all, except two, of the shrimp tested, was EHP-positive by PCR test. The two EHP-negative shrimp, being negative in both the first- and nested-step PCR, were in the 0- (Fig. 4A) and 60-ppm (Fig. 4D) groups. Among the EHP-positive shrimp, some were positive at both steps and some only at the nested step (Fig. 4A-D). The number of shrimp with EHP-positive at both steps were 2 out of 9, 4 out of 8, 10 out of 10, and 5 out of 11 in the control, 15-, 30-, and 60-ppm groups,

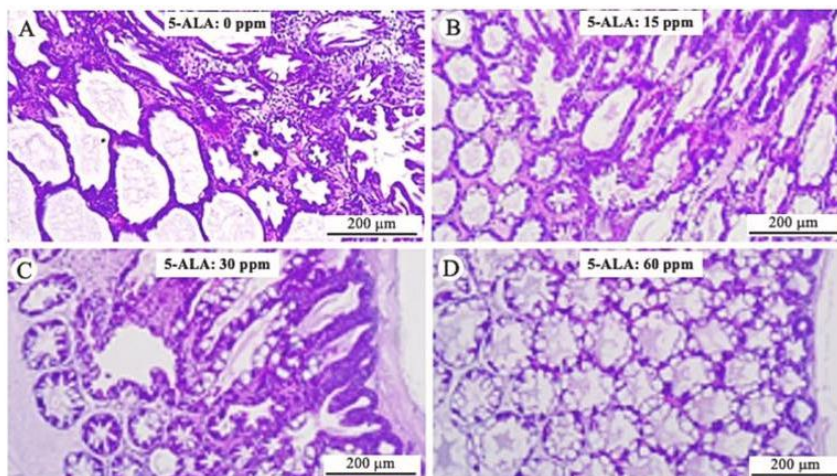


Fig. 2. Histology of the hepatopancreas of EHP-infected *L. vannamei* provided with different doses of 5-ALA. H & E staining. Atrophic tubules, with low cuboidal epithelium and large lumen, were observed more frequently in the 0-ppm and 15-ppm groups, but normal tubules, with small star-shaped lumen, were observed more frequently in the 30-ppm and 60-ppm groups.

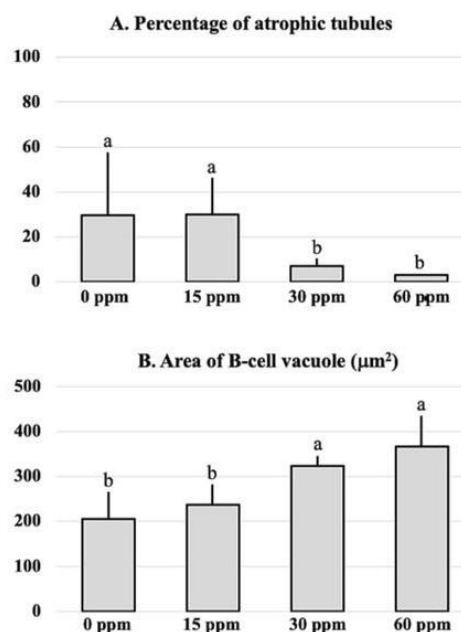


Fig. 3. The percentage of atrophic tubules (A) and areas of B-cell vacuoles (B) in the hepatopancreas of EHP-infected *L. vannamei* provided with different doses of 5-ALA. Different superscripts indicate statistically significant differences.

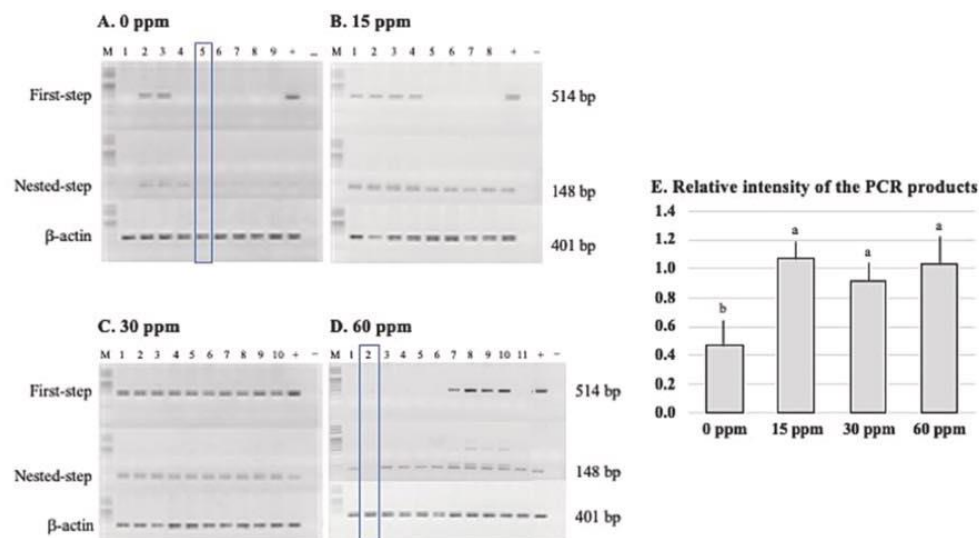


Fig. 4. Gel electrophoresis of the amplicons from PCR using primers specific for SWP of EHP (A-D) and relative intensity of the amplicons (E) of the hepatopancreas of EHP-infected *L. vannamei* provided with different doses of 5-ALA. β -actin gene was used as an internal control. M, DNA markers, +, positive control (pGEM-SWP); -, negative control (H_2O); lane numbers, hepatopancreatic samples. Two samples (A, lane 5 and D, lane 2) were PCR-negative, at both the first and nested steps. In E, different superscripts indicate statistically significant differences.

respectively.

By semi-quantitative analysis of the density of the positive bands at the nested-step PCR standardized with the β -actin band, the relative intensity of EHP bands of all the 5-ALA treatment groups was significantly higher ($p < 0.01$) than that of the control group (Fig. 4E). The relative density of all the 5-ALA-treated groups did not differ.

In histology, EHP was featured as a cluster of red granules ($\sim 1 \mu m$) or scattering granules (Fig. 5). The cluster was the different vegetative stages of EHP, i.e., plasmodium, or sporoblast, or sporocyst, and the scattering granules were mature EHP spores. EHP at various stages was more frequently observed in the M- and F-cells than in the R- and B-cells. In one section, mature EHP spores were released from an F-cell into the hepatopancreatic lumen (Fig. 5C).

3.4. ATP levels in the hepatopancreas

The ATP levels of the control and 15-ppm groups were 0.12 and 0.19 nmol/ μL , respectively, which did not differ statistically (Fig. 6). The ATP levels of the 30- and 60-ppm groups were significantly higher ($p < 0.05$) than that of the control group but not significantly different from that of the 15-ppm group.

4. Discussion

This study revealed that the survival rate and biomass of *L. vannamei* infected with EHP were improved by oral intake of 5-ALA at the dose of 60 ppm/kg pellets. The exogenous 5-ALA also increased ATP content in the shrimp hepatopancreas. On the negative side, the treatment also increased EHP load in the hepatopancreatic cells.

The 1.6-fold increase in the biomass by 5-ALA supplement at 60 ppm, compared to the control, would be a substantial increase in the production at the commercial scale if the same result could be achieved in the field.

The finding that 5-ALA increased the ATP production in the hepatopancreas of the EHP-infected shrimp is not a surprise since 5-ALA is the sole precursor of heme, which is a prosthetic group of cytochromes in the electron transport chain that generates ATP (Ogura et al., 2011; Hara et al., 2016; Ota et al., 2017). This result corresponds to the report by other investigators, who reported the 5-ALA-induced increasing ATP production in *L. vannamei* (Pedrosa-Gerasmio et al., 2018). In this study, the increasing levels of ATP might have provided the hepatopancreatic cells, both the EHP-infected and normal cells, more energy to support their metabolism and probably restore the functions of the EHP-infected cells. The reduction in the percentage of the atrophic tubules and the increasing areas of vacuoles in the B-cells are likely the evidence of this restoration, in which the response to 5-ALA was dose-related.

Five cell types constituted the hepatopancreatic tubular epithelium have been described: E-, M-, R-, F-, and B-cells (Hu and Leung, 2007; Nunes et al., 2014; Vogt, 2019). Vogt (2019) studied the functions of all cell types in the hepatopancreas of decapod crustaceans by immunohistochemistry, *in situ* hybridization, and monitoring ultrastructural changes of cells under different conditions and summarized as follows: E (embryonic)-cells, being located at the distal parts of the tubules and function as the reserve cells for all cell types; R (resorptive)-cells, containing several small vacuoles, serve for the absorption and metabolism of nutrients, storage of energy reserves and minerals, synthesis of lipoproteins for export to other organs, detoxification of heavy metals, and excretion of uric acid; F (fibrillar)-cells synthesize digestive enzymes and blood proteins involved in oxygen transport and immune defense; B (blister-like)-cells, containing single large vacuole, are assumed to produce and recycle fat emulsifiers; and M (midget)-cells are probably hormone-producing cells. B-cells secrete their products into the hepatopancreatic lumen by holocrine mode of secretion (Vogt, 1994). In addition, Hu and Leung (2007) reported that B-cells contained cathepsin L, an endopeptidase, and F-cells, contained the *CaL* gene that produces cathepsin L; by this, they suggested that F- and B-cells may be the same

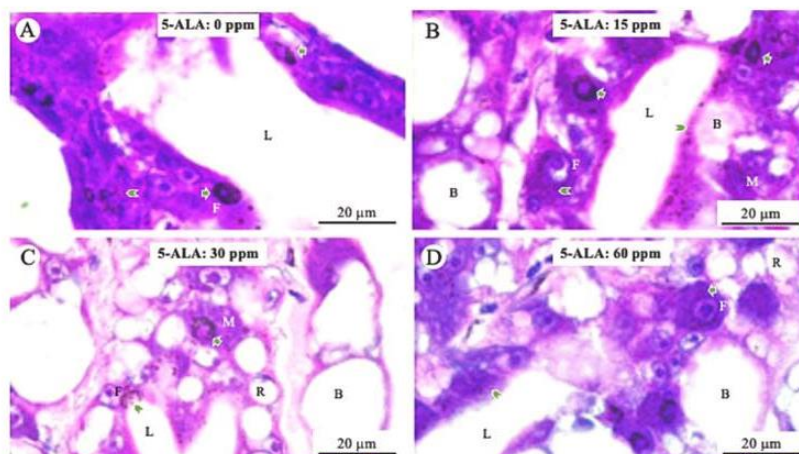


Fig. 5. Histology of the hepatopancreas of EHP-infected *L. vannamei* provided with different doses of 5-ALA (A-D). The features of EHP inside the hepatopancreatic cells can be divided into two types; one as a cluster of red granules (arrow) and another as a scattering of red granules (arrowhead). The cluster is EHP at the vegetative stage (plasmodium, sporoblast, or sporocyst) and the scattering granules are mature EHP spores. H & P staining. B, B-cells; F, F-cells; L, lumen; M, M-cells; R, R-cells. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

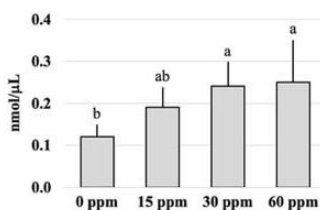


Fig. 6. ATP level in the hepatopancreas of EHP-infected *L. vannamei* provided with different doses of 5-ALA. Different superscripts indicate statistically significant differences.

cell types, but are in different stages of development.

The finding in this study that the areas of B-cell vacuoles were lowest in the control shrimp and significantly increased following 5-ALA treatments at 30 and 60 ppm suggests that the accumulation of fat emulsifier and/or cathepsin L was increased by the treatments. If B-cells are the later stage of F-cells as suggested by a previous report (Hu and Leung, 2007), it could be deduced that 5-ALA might have improved the function of F-cells, resulting in B-cells containing more digestive enzymes, compared with the control EHP-infected shrimp. Thus, 5-ALA might have improved the shrimp digestibility and increased their nourishment.

The reduced mortality of the EHP-infected shrimp by 5-ALA may be due to other factors besides improved nourishment. It has been shown that the hepatopancreas is also the source of antimicrobial peptides and molt-related proteins although it has not been elucidated what cell types produce these peptides/proteins (Tassanakajon et al., 2013; Tseng et al., 2002; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2004; Pedrosa-Gerasmio et al., 2018). The enhanced ATP production by 5-ALA also partially restore the levels of antimicrobial peptides and molt-related proteins, and helped reduce shrimp mortality from AHPND (Pedrosa-Gerasmio et al., 2018, 2019; Direkbusarakom et al., 2021).

On the negative side, this study also showed that 5-ALA increased EHP load in the hepatopancreas, in a dose-related manner. This effect is likely to occur since 5-ALA stimulated ATP production, both in the normal and EHP-infected cells, therefore, EHP would gain benefit from the treatment as well. From this study, the benefit of the shrimp's metabolic functions that enhance the digestive ability, the host defense, and the molting activities, outweighed the adverse effect of the increasing load of EHP. However, it needed to be proven that this "double sword" effect would still hold in a commercial farming situation.

Two out of 38 shrimp in this study were PCR-negative, suggesting that 5% of the shrimp might have been EHP-resistant. This finding needs to be confirmed with more shrimp samples and, if so, studies on the mechanism(s) of this resistance would be very important. Under the current situation of the farmed shrimp industry, EHP-resistant strains of *L. vannamei* are badly needed.

5. Conclusions

Oral supplements of 5-ALA at 60 ppm/kg pellets helped reduce mortality and improve the biomass production of EHP-infected *L. vannamei*. The supplement reduced histopathology, increased ATP production, and increased EHP load in the hepatopancreas. It is likely that 5-ALA acts through its enhancing heme production and facilitates increased hemoproteins of the hepatopancreas, which are involved in the electron transport chain, host defenses, and molting activities. The increasing EHP load by 5-ALA may reflect the enhanced generation of the pathogen from an increasing ATP in the EHP-infected cells as well.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Duangkhaetita Kanjanasopa reports financial support was provided by Thai Union Company.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

We would like to thank the Discipline of Excellence in Sustainable Aquaculture, Prince of Songkla University, grant no. TAMDOE60040, and NSRF via the Program Management Unit for Human Resources & Institutional Development, Research and Innovation, grant no. B05F640137, for financial support, and Thai Union Company for chemical and material supports.

References

- Aldama-Cano, D.J., Sanguanrut, P., Munkongwongsi, N., Ibarra-Gómez, J.C., Itathiphaissarn, O., Vanichviriyakit, R., Flegel, T.W., Sritunyaluksana, K., Thitamadee, S., 2018. Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Aquaculture* 490, 156–161.
- Chajjarasphong, T., Munkongwongsi, N., Stentiford, G.D., Aldama-Cano, D.J., Thansa, K., Flegel, T.W., Sritunyaluksana, K., Itathiphaissarn, O., 2021. The shrimp microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP): biology, pathology, diagnostics and control. *J. Invertebr. Pathol.* 186 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107458>, 107458.
- Chayaburakul, K., Nash, G., Pratanpipat, P., Sriurairatana, S., Withyachumnaankul, B., 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 60, 89–96.
- Corradi, N., Keeling, P.J., 2009. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *J. Fungal Biol. Rev.* 23 <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.05.001>. ISSN 1749-4613.
- Direkbusarakom, S., Kinoshita, H., Poojjan, C., Saeng-ngern, S., Wuthisuthimehavee, S., 2021. 5-aminolevulinic acid's effects on immune-related gene expression and acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) protection in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Fish Pathol.* 55, 125–131.
- DOF, 2021. Report on the situation of Thai marine shrimp. In: Fisheries Economic Division. <https://www.fisheries.go.th/strategyfishercon>.
- Flegel, T.W., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 166–173. ISSN 0022-2011. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.004>.
- Hara, T., Koda, A., Nozawa, N., Ota, U., Kondo, H., Nakagawa, H., Kamiya, A., Miyashita, K., Itoh, H., Nakajima, M., Tanaka, T., 2016. Combination of 5-aminolevulinic acid and ferrous ion reduces plasma glucose and hemoglobin A1c levels in Zucker diabetic fatty rats. *FEBS Open Bio.* 6, 515–528.
- Hu, K.J., Leung, P.C., 2007. Food digestion by cathepsin I and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. *J. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 146, 69–80.
- Jaroenlak, P., Sanguanrut, P., Williams, B.A., Stentiford, G.D., Flegel, T.W., Sritunyaluksana, K., Itathiphaissarn, O., 2016. A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms. *J. PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166320>.
- Möbius, K., Arias-Carrión, R., Breckau, D., Hännig, A.L., Riedmann, K., Biedendieck, R., Schroder, S., Becher, D., Magalon, A., Moser, J., Jahn, M., Jahn, D., 2010. Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation. *Proc. J. Nat. Acad. Sci.* 107, 10436–10441.
- Nima, N., Duangsuwan, P., Pongtipatee, P., Kanjanasopa, D., Withyachumnaankul, B., 2022. Types of cells in the hepatopancreas of the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* being infected by *Enterocytozoon hepatopenaei*. *J. SJSST* 44, 97–102.
- Nunes, E.T., Braga, A.A., Camargo-Mathias, M.I., 2014. Histochemical study of the hepatopancreas in adult females of the pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* Latreille, 1817. *Acta Histochem.* 116, 243–251.
- Ogura, S.I., Maruyama, K., Hagiya, Y., Sugiyama, Y., Tsuchiya, K., Takahashi, K., Abe, F., Tabata, K., Okuta, I., Nakajima, M., Tanaka, T., 2011. The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome c oxidase activity in mouse liver. *J. BMC Res. Notes* 4, 66. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-66>.
- Ota, U., Hara, T., Nakagawa, H., Tsuru, E., Tsuda, M., Kamiya, A., Kuroda, Y., Kitajima, Y., Koda, A., Ishizuka, M., Fukuhara, H., Inoue, K., Shuin, T., Nakajima, M., Tanaka, T., 2017. 5-aminolevulinic acid combined with ferrous ion reduces adiposity and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice via enhancing mitochondrial function. *J. BMC Pharmacol. Toxicol.* 18, 7. <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0108-3>.
- Patil, P.K., Geetha, R., Ravisankar, T., Avunje, S., Solanki, H.G., Abraham, T.J., Vinoth, S. P., Jithendran, K.P., Alavandi, S.V., Vijayan, K.K., 2021. Economic loss due to diseases in Indian shrimp farming with special reference to *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and white spot syndrome virus (WSSV). *J. Aquac.* 533, 736231 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736231>.
- Pattarayingsakul, W., Munkongwongsi, N., Thitamadee, S., Sritunyaluksana, K., Diva, J., Aldama-Cano, D.J., 2022. Shrimp microsporidian EHP spores in culture water lose activity in 10 days or can be inactivated quickly with chlorine. *Aquaculture* 548. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737665>. Part 2, 2022. 737665, ISSN 0044-8486.
- Pedrosa-Gerasmio, I.R., Tanaka, T., Sumi, A., Kondo, H., Hirono, I., 2018. Effects of 5-aminolevulinic acid on gene expression, immunity, and ATP levels in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. Mar. Biotechnol.* 20, 829–843.
- Pedrosa-Gerasmio, I.R., Kondo, H., Hirono, I., 2019. Dietary 5-aminolevulinic acid enhances adenosine triphosphate production, ecdysis and immune response in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *J. Aquac. Res.* 50, 1131–1141.
- Rajendran, K.V., Krishnan, A.N., Pande, A., Rajan, J.J.S., Vijayan, K.K., Praveena, P.E., Alavandi, S.V., Prasad Babu, S.V.A.N.V., Shivam, S., Avunje, S., Kumar, T.S., Jagadeesan, V., 2016. Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in India. *Aquaculture* 454, 272–280.
- Reinking, J., Lam, M.M., Pardee, K., Sampson, H.M., Liu, S., Yang, P., Williams, S., White, W., Lajoie, G., Edwards, A., Krause, H.M., 2005. The drosophila nuclear receptor e75 contains home and is gas responsive. *J. Cell* 122, 195–207.
- Shemin, D., Russell, C.S., 1953. 5-Aminolevulinic acid: its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4873–4874.
- Suebsing, R., Prombun, P., Srisala, J., Kitpathomchai, W., 2013. Loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric nanogold for detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1254–1263.
- Tang, K.F., Han, J.E., Aranguren, L.F., White-Noble, B., Schmidt, M.M., Piamsomboon, P., Risdiana, E., Hanggono, B., 2016. Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* 140, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.004>.
- Tassanakajon, A., Somboonwivat, K., Supungul, P., Tang, S., 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *J. Fish Shellfish Immunol.* 34, 954–967.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Grant, D., Kelly, S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyaluksana, K., Withyachumnaankul, B., 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): fine structure and phylogenetic relationships. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 21–29.
- Tseng, D.-Y., Chen, Y.-N., Liu, K.F., Kou, G.H., Lo, C.F., Kuo, C.M., 2002. Hepatopancreas and ovary are sites of vitellogenin synthesis as determined from partial cDNA encoding of vitellogenin in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Invert. Reprod. Develop.* 42, 137–143.
- Vogt, G., 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *J. Zoomorphol.* 114, 83–101.
- Vogt, G., 2019. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *J. Morphol.* 280, 1405–1444.
- Wan Sajiri, W.M.H., Borkhamuddin, M.H., Kua, B.C., 2021. Occurrence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection on *Penaeus vannamei* in one rearing cycle. *J. Dis. Aquat. Org.* 144, 1–7. <https://doi.org/10.3354/diao03571>.
- Yang, S., Huang, H., Wang, F., Aweya, J.J., Zheng, Z., Zhang, Y., 2018. Prediction and characterization of a novel hemocyanin-derived antimicrobial peptide from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Amino Acids* 50, 995–1005.
- Zhang, X., Huang, C., Qin, Q., 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *J. Antiviral Res.* 61, 93–99.
- Zhao, R., Gao, W., Qiu, L., Chen, X., Dong, X., Li, C., 2020. Huang J (2020) A staining method for detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) spores with calcofluor white. *J. Invertebr. Pathol.* 172 (172), 107347 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107347>.