บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาวาในโรงเพาะฟัก

จากผลการทดลองที่1 ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีตั้งแต่ระยะโพสต์ลาวา 1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา และพบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อส่วนใหญ่จะเพิ่มขึ้นหลังจากการพบเชื้อในระยะโพสต์ลาวา 1 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ramasamy และคณะ (1995) ที่สำรวจการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในธรรมชาติ โดยศึกษาการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำวัยอ่อนจนถึงระยะโพสต์ลาวาในกุ้งกุลาดำจากประเทศฟิลิปปินส์และตาฮิติ พบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในระยะ โพสต์ลาวา 5 –40 แสดงให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำในระยะวัยอ่อนมักมีการติดเชื้อน้อย และความรุนแรงต่ำทำให้ตรวจวินิจฉัยได้ยากหรือไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้จนกระทั่งเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะโพสต์ลาวา จะเริ่มพบการติดเชื้อและมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสูงสุดที่ระยะนี้ และจะมีอัตราการตายสูงมากด้วย คาดว่าการติดเชื้อในโรงเพาะฟักอาจจะเกิดจากการที่พ่อแม่พันธุ์ปล่อยออกคลูชั่นบอดีที่มีขนาดเล็กออกมาแล้วมีการปนเปื้อนหรือติดอยู่บนเปลือกไข่ไปสู่ถังอนุบาลลูกกุ้งระยะนอเพลียส จากนั้นเมื่อกุ้งเริ่มมีการกินอาหารที่ระยะซูเอีย ออกคลูชั่นบอดีที่มีขนาดเหมาะสมอาจจะถูกกินเข้าไปด้วยในระยะนี้หรือระยะไมซิส จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีจำนวนไม่มากจะมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ตับและตับอ่อนและมีการสร้างออกคลูชั่นบอดีเพิ่มขึ้น จากนั้นเมื่อมีการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสหรือออกคลูชั่นบอดีจากเซลล์ไปยังท่อตับและตับอ่อนผ่านทางเดินอาหารและถ่ายออกสู่ภายนอกตัวกุ้งซึ่งถ้ากุ้งตัวอื่นกลืนกินออกคลูชั่นบอดีเข้าไป จะทำให้มีการติดเชื้อจากตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่งได้และมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว เหมือนกับรายงานที่เกิดกับแบคคูโลไวรัสในตัวอ่อนแมลง (Faulkner, 1981) และไวรัสบีเอ็มเอ็น (BMN)ในกุ้งคุรูม่า (Momoyama and Sano, 1989) นอกจากนี้การพบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในระยะนอเพลียสแต่ไม่พบติดเชื้อในระยะ ซูเอีย ไมซิสและโพสต์ลาวา อาจเป็นผลเนื่องจากการปนเปื้อนของออกคลูชั่นบอดีหรืออนุภาคไวรัสที่ติดมาจากพ่อแม่พันธุ์ในถังเพาะฟัก และหลังจากนั้นอาจมีการทำความสะอาดนอเพลียสก่อนนำไปลงเลี้ยงในถังอนุบาล ทำให้สามารถตรวจพบเฉพาะในระยะนอเพลียส อย่างไรก็ตามการล้างไข่หรือนอเพลียสด้วยสารละลายไอโอดีนหรือฟอร์มาลีนทำให้ช่วยลดการปนเปื้อนของอนุภาคไวรัสและออกคลูชั่นบอดีที่ติดมา และลดโอกาสในการติดเชื้อได้ ดังรายงานวิจัยของ Chen และคณะ (1992) กล่าวไว้ว่า การป้องกันการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในโรงเพาะฟักสามารถทำได้โดยการนำนอเพลียส หรือไข่ที่เพิ่งฟัก มาแช่เป็นเวลาสั้นๆในฟอร์มาลีนที่มีความเข้มข้น 200-

300 ppm และไอโอโดฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 20-30 ppm การนำลูกกุ้งมาแช่สารละลายดังกล่าว และการเลี้ยงด้วยน้ำทะเลที่สะอาดจะช่วยยืดเวลาการติดเชื้อหรือช่วยไม่ให้ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้ ดังนั้นการฆ่าเชื้อลูกกุ้งก่อนนำไปเลี้ยงและการเลี้ยงในน้ำที่สะอาดรวมไปถึงการจัดการที่ดีในโรงเพาะฟักจะเป็นวิธีที่สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในโรงเพาะฟักได้ นอกจากนี้ถ้ามีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติก่อนนำมาใช้ในโรงเพาะฟัก ร่วมกับการจัดการลูกพันธุ์ดังที่กล่าวมาจะทำให้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีได้ดียิ่งขึ้น การใช้วิธีนี้สามารถป้องกันการติดเชื้อไวรัสบีเอ็มเอ็น (BMN) ในกุ้งคุรูม่าได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Momoyama and Sano, 1989)

2. การเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำระยะวัยรุ่น (juvenile) ที่เลี้ยงในบ่อดิน

จากผลการทดลอง พบว่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีของกุ้งกุลาดำจะลดลงเมื่อกุ้งโตขึ้นในบ่อดิน และยังพบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีในช่วงท้ายของการศึกษา สอดคล้องกับรายงานของ Ramasamy และคณะ (1995) ที่สำรวจกุ้งระยะโพสต์ลาวา 20 – 37 ที่มีความยาว carapace ตั้งแต่ 2 –7 มิลลิเมตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การพบเชื้อจะลดลงเมื่ออายุมากขึ้นโดยเปรียบเทียบความยาวของ carapace ที่เพิ่มขึ้น และนอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีเพิ่มขึ้นในกุ้งที่อายุมากขึ้น สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่ลดลงอาจเกิดจากกุ้งมีความต้านทานต่อโรคไวรัสเอ็มบีวีมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Leblanc และ Overstreet (1990) ได้ทำการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสบีพีในกุ้งขาวแปซิฟิก (*Penaeus vannamei*) ที่อายุต่างกัน โดยการทดลองให้กินอาร์ทีเมียที่มีเชื้อไวรัสบีพี พบว่า กุ้งระยะวัยอ่อน จะมีระยะการติดเชื้อแต่ยังไม่แสดงอาการของโรค (patent period) 1 ถึง 2 วันในกุ้งระยะโพสต์ลาวา 5 วัน และในกุ้งอายุ 1 เดือนมีระยะเวลา 7 - 8 วัน ส่วนในกุ้งที่มีอายุมากกว่า 6 เดือน ไม่พบพยาธิสภาพของเซลล์ที่เกิดจากเชื้อไวรัสบีพี แสดงให้เห็นว่าความต้านทานโรคของกุ้งที่อายุมากขึ้นจะสัมพันธ์กับระยะการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการของโรคซึ่งจะมีระยะเวลานานมากขึ้น และบางครั้งก็ไม่มีการติดเชื้อเกิดขึ้น ซึ่งระยะก่อนการติดเชื้อและระยะการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกันคือ อายุ พันธุกรรม ภาวะโภชนาการของพ่อแม่พันธุ์และลูกพันธุ์ รวมทั้งความเครียดด้วย จากผลการทดลองที่ตรวจพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีลดลงในกุ้งที่อายุมากขึ้น อาจเป็นเพราะกุ้งมีความต้านทานต่อโรคมากขึ้น หรือกุ้งอาจมีการยอมรับเชื้อแต่ไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่เกิดพยาธิสภาพ การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำจะไม่เกิดขึ้นถ้าได้รับการดูแลในการจัดการตั้งแต่โรงเพาะฟักและการอนุบาลที่ถูกต้องจะช่วยให้มีอัตรารอดเพิ่มขึ้นทั้งในการเพาะฟัก การอนุบาล รวมทั้งในบ่อดินด้วย (Lightner

et al., 1987) และกุ้งสามารถต้านทานการติดเชื้อโรคไวรัสเอ็มบีวีได้หากมีการเลี้ยงกุ้งในสภาวะที่เหมาะสมที่ไม่ก่อให้เกิดความเครียดเช่นเดียวกับการติดเชื้อแบคคูโลไวรัสในปูสีน้ำเงิน (Couch, 1981) ซึ่งถ้าในบ่อดินที่ศึกษามีการเลี้ยงกุ้งทีสภาวะที่เหมาะสม กุ้งมีสุขภาพดี อาจทำให้กุ้งมีความสามารถในการต้านทานได้มากขึ้น

จากการศึกษาค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำตลอดการเลี้ยงกับค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของความยาวและน้ำหนักตัว โดยการวิเคราะห์ความถดถอยและสหสัมพันธ์จากการสร้างกราฟแผนภาพการกระจายเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ซึ่งจากค่า R^2 ของทั้งสองค่าแสดงให้เห็นว่า ข้อมูลดังกล่าวมีการกระจายตัวมาก ทำให้ไม่มีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความแปรปรวนของความยาวและน้ำหนักตัวกับค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี แต่จากการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของข้อมูลทั้งความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของกุ้งกุลาดำในทุกบ่อที่ศึกษา โดยเฉพาะน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนส่วนใหญ่มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวชี้ให้เห็นถึง ประชากรที่มีขนาดแตกต่างกันมาก ทั้งนี้ Flegel และคณะ (1997) ได้กล่าวถึงปัญหากุ้งโตช้าและผลผลิตกุ้งที่ได้มีขนาดแตกต่างกันทำให้ไม่ตรงกับความต้องการของตลาด ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมกุ้งของไทย และจากการสำรวจในปี 1994 พบว่าขนาดของกุ้งที่จำหน่ายออกสู่ตลาดมีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนถึง 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เนื่องจากไวรัสเอ็มบีวีเป็นสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลให้กุ้งมีการเจริญเติบโตลดลง เป็นผลให้กุ้งโตช้าและมีขนาดแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chang และ Chen (1994) พบว่ากุ้งกุลาดำในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีมีการเจริญเติบโตลดลงและมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ากุ้งในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัส เอ็มบีวีมีขนาดตัวที่แตกต่างกันมาก ซึ่งเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นทำให้เน้นย้ำถึงความสำคัญของการลดหรือการป้องกันการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีอันจะก่อให้เกิดผลดีต่อผลผลิตกุ้งกุลาดำ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากกว่าการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคอิมเพรสชั่นเสมียร์ เมื่อเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำดังกล่าว อาจสรุปได้ว่าการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยามีความแม่นยำกว่าการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคอิมเพรสชั่นเสมียร์ จากรายงานการศึกษาของ Vicker และคณะ (1993) ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งออสเตรเลียด้วยวิธีอิมเพรสชั่นเสมียร์ โดยนำตับอ่อนของกุ้งระยะโพสต์ลาวา 25 มาบดแล้วเกลี่ยบนสไลด์ แล้วย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซีลินและอีโอซิน จากการทดลอง 12 ครั้ง พบว่า มีอย่างน้อย 10 ครั้งที่ตรวจพบได้ว่ากุ้งติดเชื้อภายในวันที่4 หลังจากการทำให้ติด

เชื้อ และจากรายงานของ Lightner และคณะ (1993) ศึกษาการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีในเนื่อเยื่อตับและตับอ่อนกุ้ง โดยการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคอิมเพรสชั่นเสมียร์ สามารถทำได้โดยการนำตับและตับอ่อนของกุ้งมาบดแล้วเกลี่ยบนสไลด์ แล้วตรึงเนื้อเยื่อด้วยเมทานอล แล้วย้อมด้วยสีจิมซ่า (Giemsa) พบว่า ความไวของการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคอิมเพรสชั่นเสมียร์ มีค่าอยู่ในช่วง 67 – 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา และความแม่นยำของการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิค อิมเพรสชั่นเสมียร์ ขึ้นอยู่กับการตรวจพบออกคลูชั่นบอดีในตัวอย่าง ทั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในระยะแรกๆที่เกิดการบวมของนิวเคลียสและการติดเชื้อที่อยู่ในระหว่างการสร้างออกคลูชั่นบอดีได้ ขณะที่การตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อวิทยามีความแม่นยำกว่าเนื่องจากสามารถมองเห็นพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ดีกว่า จากผลการทดลองที่ 2 ได้ทำการศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่เกิดขึ้นเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิคต่างกัน คือ เทคนิคอิมเพรสชั่นเสมียร์ และเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา การศึกษาด้วยเทคนิคอิมเพรสชั่นเสมียร์ โดยนำตับและตับอ่อนมาเกลี่ยบนสไลด์โดยตรงแล้วผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เพื่อย้อมสีทำให้สามารถเห็นออกคลูชั่นบอดีมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยมขนาดต่างๆกัน ติดสีแดงของอีโอซิน จะเห็นว่ามีบางส่วนที่ยังอยู่ในเซลล์ของท่อตับและบางส่วนที่อยู่ในเซลล์ที่หลุดออกมาเดี่ยวๆ เช่นเดียวกันที่ Vicker และคณะ (1993) ทดลองให้กุ้งระยะโพสต์ลาวา 3-15 ติดเชื้อ โดยใช้หัวเชื้อจากลูกกุ้งหรือตับกุ้งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติจากรัฐควีนสแลนด์ จึงนำกุ้งที่ติดเชื้อไปทำอิมเพรสชั่นเสมียร์ แล้วตรวจสอบเซลล์บุผิว ตรวจพบออกคลูชั่นบอดีเดี่ยวๆและเป็นกลุ่มอยู่ในเซลล์บุผิวท่อตับอ่อนของกุ้งโพสต์ลาวา 6 - 25 ที่ติดเชื้อ 2 - 10วัน นอกจากนี้ยังพบออกคลูชั่นบอดีภายนอกเซลล์ทั้งที่อยู่เดี่ยวๆและเป็นกลุ่มซึ่งน่าจะเกิดจากขั้นตอนการทำอิมเพรสชั่นเสมียร์ ทำให้เซลล์แตกและออกคลูชั่นบอดีหลุดออกมานอกเซลล์ นอกจากนี้การตรวจดูออกคลูชั่นยังสามารถทำได้ในกรณีที่ตับอ่อนมีการติดเชื้อมากๆ สามารถนำตับอ่อนมาปี้บนสไลด์แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเฟส คอนทราสท์ได้ ส่วนการศึกษาด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ตับและตับอ่อนที่ปกติ จะสังเกตุเห็นการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ พบออกคลูชั่นบอดีในนิวเคลียสของเซลล์ท่อตับและตับอ่อน สอดคล้องกับการศึกษาของ Fegan และคณะ (1991)ระยะวัยอ่อน โดยนำกุ้งกุลาดำระยะนอเพลียสจากโรงเพาะฟักต่างๆพบว่ามีออกคลูชั่นบอดีในทางเดินอาหาร และพบ ออกคลูชั่นบอดีบริเวณใกล้ๆส่วนปลายของท่อตับและไม่พบออกคลูชั่นบอดีในส่วนที่ไกลจากบริเวณท่อตับหรือเซลล์อี (generative cells :E cell) เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Chen และคณะ (1989) ที่เคยรายงานไว้ว่าในเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ กุ้งหางแดง

(*Penaeus penicillatus*) เซลล์เอฟ เซลล์บี และเซลล์อาร์ เป็นเซลล์ที่ง่ายต่อการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี และเซลล์ที่ติดที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงจะเกิดเนื้อเยื่อตายและมีการแตกสลายของเซลล์ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์บริเวณท่อตับและตับอ่อน และพบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีในเซลล์ท่อตับและตับอ่อนด้วย โดยสังเกตุเห็นอินคลูชั่นบอดีของไวรัสเอชพีวีติดสีน้ำเงิน อยู่ภายในนิวเคลียส สอดคล้องกับรายงงานของ Sukhumsirichart และคณะ (1999) ซึ่งทำการสุ่มตรวจในตับและตับอ่อนกุ้งกุลาดำ จะพบลักษณะของนิวเคลียสบวมพอง และมีอินคลูชั่นบอดีของไวรัสเอชพีวีที่ติดสีน้ำเงินของสีฮีมาท็อกซิลินอยู่ภายในนิวเคลียส นอกจากนี้แล้วพบการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีและเอชพีวีพร้อมกันในตัวอย่างกุ้งที่นำมาศึกษา มีรายงานการศึกษาที่พบการติดเชื้อร่วมกันของเอ็มบีวีและเอชพีวีในไต้หวันและเชื่อว่าไวรัสเอชพีวีเป็นเชื้อกก่อโรคที่สำคัญเช่นกัน (Chen *et al*., 1989) ในขณะเดียวกันมีรายงานว่าส่วนใหญ่จะพบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีร่วมกับการติดเชื้อเอ็มบีวี โดยมากไม่ค่อยพบการติดเชื้อเอชพีวีเพียงชนิดเดียว โดยการศึกษาของ Lightner และคณะ (1992) ในกุ้งกุลาดำจากไต้หวันและอินโดนีเซีย มักพบการติดเชื้อเอ็มบีวีและเอชพีวีร่วมกันในกุ้งระยะโพสต์ลาวาและระยะวัยรุ่น

3.ศึกษาผลของอาหารชนิดต่างๆที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาผลของอาหารที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี โดยเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่ามีความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในแต่ละชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่2 ที่ได้รับอาร์ทีเมียมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อลดลงและมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อน้อยที่สุดในสัปดาห์ที่ 8 และ 10 คาดว่าอาร์ทีเมียมีคุณค่าอาหารที่ดีและเหมาะสม ทำให้กุ้งมีสุขภาพดีสามารถที่จะต้านทานต่อการติดเชื้อได้มากกว่ากุ้งที่สุขภาพไม่ดี ซึ่งพบว่าจากการศึกษาของ Vogt และคณะ (1986) กล่าวว่ากุ้งที่ได้รับภาวะทุพโภชนาการจะส่งผลให้มีการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี และหลังจากที่ให้กุ้งกินอาหารที่สมบูรณ์ภายใน 4 วันพบว่า ไม่พบอนุภาคไวรัสเอ็มบีวีภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ เชื่อว่าเมื่อกุ้งได้รับโภชนาการการที่ดี จะช่วยต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวี ทั้งนี้อาร์ทีเมียเป็นอาหารที่ดีเหมาะสมหรับใช้เลี้ยงสัตว์ทะเลวัยอ่อน (Leger *et al*., 1986) และอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลกมีความต้องการอาร์ทีเมียที่มีคุณภาพมากขึ้น (Lavens and Sorgeloose, 2000) เมื่อนำอาร์ทีเมียให้ลูกกุ้ง *Palaemon serratus* วัยอ่อนกิน พบว่ากุ้งมีการพัฒนาจากระยะวัยอ่อนถึงระยะโพสต์ลาวาได้อย่างสมบูรณ์ (Wickins, 1972) ในลูกปลาซีกเดียว *Solea senegalensis* วัยอ่อน ที่ได้กินอาร์ทีเมียวัยอ่อนและอาร์ทีเมียแช่แข็งพบว่ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจากระยะวัยอ่อนจนถึง 40 วันหลังจากฟัก (Danis *et al*., 1999) จากการรายงานการวิจัย

กล่าวว่า อาร์ทีเมียมีชีวิตระยะโตเต็มวัยเป็นหนึ่งในอาหารที่ดีที่สุดในการเพาะเลี้ยงลูกปลาวัยอ่อน และครัสตาเชียนวัยอ่อน (Millikin *et al*., 1980 ; Lellis, 1992 ; Soundarapandian *et al*., 1998) และอาร์ทีเมียระยะโตเต็มวัยมีคุณค่าทางโภชนาการดีกว่าอาร์ทีเมียวัยอ่อน ยังไม่มีรายงานที่กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อในตัวสัตว์หรือการเปลี่ยนแปลงทางภูมิคุ้มกันเมื่อได้รับ อาร์ทีเมีย แต่อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่า กุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาร์ทีเมีย อาจมีการกินอาหารที่ดีกว่าและทำให้สุขภาพดีดังรายงานที่กล่าวมาซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งที่ช่วยให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อลดลง จากผลการทดลองนี้ พบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ 2 ที่ได้รับอาร์ทีเมีย มีเปอร์เซ็นต์การรอดแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆมาก แต่จะเห็นว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดในทุกชุดการทดลองค่อนข้างต่ำ สอดคล้องกับรายงานของ Ramasamy และคณะ (2000) กล่าวว่า อัตราการตายของกุ้งในระยะโพสต์ลาวาของกุ้งกุลาดำมากว่าในระยะ ซูเอียหรือไมซิส เกี่ยวข้องกับผลของการติดเชื้อที่รุนแรงในตับและตับอ่อนในช่วง 10 –15 วัน นอกจากนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการกินกันเองของกุ้ง สอดคล้องกับรายงานของ Ishimaru และคณะ (1995) กล่าวว่าการเลี้ยงกุ้งที่ความหนาแน่นสูงจะทำให้การกระจายของประชากรกุ้งไม่สม่ำเสมอ ด้วยเหตุนี้เองทำให้การกินกันเองเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะกุ้งในระยะวัยรุ่นมักจะเกิดการกินกันเองในช่วงระยะเวลากลางคืน ซึ่งในการศึกษานี้ เลี้ยงที่ความหนาแน่น 500 ตัวต่อน้ำ 80 ลิตร และเลี้ยงนานถึง 10 สัปดาห์ เมื่อกุ้งโตขึ้นทำให้มีความหนาแน่นสูงขึ้น อาจเป็นไปได้ที่ทำให้กุ้งเกิดสภาวะเครียดและการกินกันเองขึ้น ส่งผลให้มีอัตราการรอดที่ต่ำ สอดคล้องกับ Wu และคณะ (2001) รายงานว่า การเลี้ยงที่ความหนาแน่นต่ำกว่าทำให้กุ้งมีอัตราการตายที่ต่ำกว่าการเลี้ยงความหนาแน่นสูง และจากผลการศึกษานี้ยังพบว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเม็ดและอาหารสดมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวน้อยมาก 485.50 $\pm$ 45.60 และ 98.20 $\pm$ 20.70 เปอร์เซ็นต์ **ตามลำดับ** เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับ อาร์ทีเมียมีน้ำหนักเฉลี่ย 987.90 $\pm$ 173.90 มิลลิกรัม ซึ่งการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากการได้รับอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารที่แตกต่างกันมาก เนื่องจากการศึกษานี้มิได้ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารจึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลจากรายงานการศึกษาต่างๆ โดยพบว่าอาร์ทีเมีย ประกอบด้วย โปรตีน 62.5 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 12.5 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 6.25 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 3.125 เปอร์เซ็นต์ (www.artemia-international.com) อาหารเม็ดสำเร็จรูปประกอบด้วย โปรตีน 38 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 5 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 3 เปอร์เซ็นต์ (ข้อมูลจากบริษัทผู้ผลิต) ส่วนหอยแครงประกอบด้วย โปรตีน 70.59 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 3.53 เปอร์เซ็นต์ (www.fish-foundation.org.uk) นอกจากชนิดของอาหารที่แตกต่างกันจะทำให้มีการเจริญโตที่แตกต่างกันแล้ว ยังพบว่าการได้รับอาหารที่มีกรดอะมิโนหรือกรดไขมันบางตัวไม่สมดุล จะส่งผลต่อการเจริญเติบโต

ด้วย (วุฒิพร, 2541) และจากรายงานวิจัยของ Kolkovski และคณะ (1997) พบว่าอาหารมีชีวิตและอาหารสดจะมีความน่ากินมากกว่าอาหารสำเร็จรูป โดยเฉพาะอาร์ทีเมีย พบว่า อาร์ทีเมียจะปล่อยกรดอะมิโนอิสระบางตัว (free amino acid) ได้แก่ ไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) อาร์จีนีน (arginine) และเบตาอีน (betaine) ซึ่งจะกระตุ้นการกินอาหารในปลา gilhead seabream นอกจากนี้ในอาหารสดยังมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เกิดจากการสลายตัวของโปรตีนในอาหารสด (autolysis) ทำให้อาหารสามารถย่อยและดูดซึมได้เร็วกว่าอาหารสำเร็จรูป นอกจากนี้น่าจะเป็นผลมาจากพฤติกรรมการกินอาหาร สอดคล้องกับ Nunes และคณะ (1996) และ Nunes และ Parsons (2000) ได้ศึกษาถึงการกินอาหารของกุ้ง *Penaeus subtilis* พบว่า ความแตกต่างในการกินอาหารมีผลเนื่องมาจากปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ ความเข้มแสง และชนิดของอาหาร ปัจจัยเหล่านี้ล้วนแต่มีผลต่อปริมาณการกินอาหารและทำให้กุ้งที่กินอาหารได้น้อยมีการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่ากุ้งที่กินอาหารได้มากกว่า นอกจากนี้การกินอาหารของกุ้งยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยของอาหารชนิดต่างๆ หรือความว่างของกระเพาะ โดยอาหารที่มีลักษณะนุ่มสามารถย่อยได้เร็วกว่าอาหารที่แข็ง ในกุ้งกุลาดำสามารถย่อยอาหารในกระเพาะได้ 53 เปอร์เซ็นต์ใน 1 ชั่วโมง (Marte, 1980) และกุ้ง *P. setiferus* สามารถย่อยโปรตีนจากหอยนางรมได้ภายใน 2 – 3 ชั่วโมง (Feller, 1991) อาหารที่ย่อยได้ดีกว่า จะถูกย่อยหมดก่อนจึงทำให้กระเพาะอาหารว่างเร็วกว่า พร้อมที่จะกินอาหารได้มากกว่า อย่างไรก็ตามนอกจากจะควบคุมปัจจัยทางด้านอาหารให้มีความเหมาะสมกับความต้องการของกุ้งจะช่วยให้กุ้งมีความต้านทานต่อการติดเชื้อมากขึ้นแล้ว จะต้องระมัดระวังการติดเชื้อซ้ำอันเนื่องมาจากการกลืนกินออกคลูชั่นบอดีที่อยู่ในมวลน้ำหรือการกินกันเอง ทั้งนี้สามารถควบคุมได้โดยการเลี้ยงในระบบน้ำไหลหรือมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในปริมาณมากๆเพื่อขจัดการปนเปื้อนของออกคลูชั่นบอดีในน้ำและเลี้ยงในกุ้งในสภาวะความหนาแน่นต่ำซึ่งจะช่วยลดการกินกันเองของกุ้งได้

4. ศึกษาผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำที่ได้รับสภาวะความเครียดแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีที่เลี้ยงในสภาวะปกติ จากผลการสุ่มตรวจในวันที่ 3 หลังจากการทดสอบความเครียดที่สภาวะต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับสภาวะเครียดมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุม ชี้ให้เห็นว่าความเครียดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการติดเชื้อเอ็มบีวีในกุ้งกุลาดำ แต่หลังจากทดสอบความเครียดแล้วนำกุ้งกลับมาเลี้ยงต่อในสภาวะปกติในวันที่ 7 พบว่า เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อจากทุกชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติซึ่งอาจจะเป็นเพราะลูกกุ้งสามารถทนทานต่อ

ความเครียดและสามารถปรับตัวได้ สอดคล้องกับรายงานของ Samocha และคณะ (1998) กล่าวว่า อายุของกุ้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อความสามารถในการต้านทานต่อความเครียด ซึ่งพบว่าลูกกุ้งโพสต์ลาวาที่ระยะโพสต์ลาวา 7 มีความสามารถในการต้านทานต่อความเครียดได้มากกว่าและเหมาะสมในการผลิต การขนส่งและใช้เป็นลูกพันธุ์ในการเลี้ยงได้ดีกว่าลูกกุ้งวัยอ่อน เช่นเดียวกับรายงานของ Saoud และคณะ (2003) ซึ่งพบว่า กุ้งขาวแปซิฟิก *Litopenaeus vannemei* ที่ระยะโพสต์ลาวา 15 และโพสต์ลาวา 20 มีความสามารถในการทนทานต่อสภาะความเค็มต่ำได้ดีกว่าลูกกุ้งที่ระยะโพสต์ลาวา 10 เนื่องจากลูกกุ้งที่ศึกษาในครั้งนี้เป็นระยะโพสต์ลาวา 13 จึงเป็นไปได้ที่ลูกกุ้งจะมีความสามารถต้านทานต่อความเครียดได้ดี ทำให้ไม่มีความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีในลูกกุ้งดังกล่าว ในขณะที่การทดสอบความเครียดที่สภาวะต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า หลังจากทดสอบความเครียดทำให้ลูกกุ้งมี เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยในชุดการทดลองอื่นๆมากกว่าชุดควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kautsky และคณะ (2000) กล่าวว่า การเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ออกซิเจน ความเค็ม และอุณหภูมิ ทำให้เพิ่มความเครียดให้กับกุ้งและทำให้มีการยอมรับต่อเชื้อและก่อให้เกิดโรคได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการต้านทานต่อสภาวะความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของกุ้งด้วย (Harpaz and Karplus, 1991 ; Kumulu and Jones, 1995) Bray และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาพบว่า กุ้งขาวแปซิฟิก สายพันธุ์จากเอกวาดอร์มีความสามารถในการทนทานต่อสภาวะความเค็มต่ำได้ดีกว่า กุ้งขาวแปซิฟิกสายพันธุ์จากเม็กซิโก ในขณะที่กุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาลายสายพันที่เลี้ยงในตะวันออกกลางสามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำที่มีความเค็มสูง (Bray *et al*., 1992) นอกจากนี้ในส่วนของชุดการทดลองที่จำลองสภาวะการขนส่ง เมื่อทำการวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำหลังจากทดสอบความเครียดที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่าออกซิเจนละลายน้ำเท่ากับ 2.12 มิลลิกรัม/ลิตร และ 1.63 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และพบว่าที่การให้สภาวะเครียดที่ 24 ชั่งโมง มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีมากที่สุด อาจเป็นผลมาจากสภาวะความเครียดที่เกิดจากการความหนาแน่นที่ทำการบรรจุกุ้งลงในถุงขนส่งเป็นจำนวน 2,000 ตัวต่อน้ำ 2 ลิตร และภาวะออกซิเจนต่ำ ซึ่ง Liao (1988) รายงานไว้ว่า ความหนาแน่น การให้อากาศ อุณหภูมิน้ำ ความเค็ม คุณภาพน้ำ รวมทั้งของเสียที่สัตว์ปล่อยออกมา เป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลให้เกิดความเครียดในการขนส่งกุ้งคุรุม่า และเนื่องจากการขนส่งครัสตาเซียที่มีชีวิต จะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา Furusho และคณะ1988 ได้แนะนำว่าควรขนส่งในน้ำทะเลและมีการให้อากาศที่เพียงพอ เช่นเดียวกันในการศึกษาของ Ueda และคณะ (1999) ได้ทำการขนส่งกุ้งคุรุม่าในน้ำทะเล และมีการให้อากาศตลอดระยะเวลาการขนส่ง 8 ชั่วโมง ซึ่งก็พบว่าไม่มีผล

ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยการตรวจวัดการกำจัดแบคทีเรียของซีรัมกุ้ง (serum bacteridal activity) มีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ความแข็งแรงของลูกกุ้งโพสต์ลาวาจะเป็นตัวชี้บอกถึงความสามารถในการเจริญเติบโตและการรอดในอนาคต ซึ่งทำให้การทดสอบความเครียดกลายมาเป็นตัวชี้วัดที่คุณภาพของลูกกุ้งโพสต์ลาวา อัตราการรอดที่ต่ำและการขาดการวางแผนการจัดการเพื่อการเจริญเติบโตที่ดีของกุ้งในบ่อดินเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการพัฒนาไปสู่การเลี้ยงกุ้งอย่างยั่งยืน (Fegan, 1992 ; Samocha *et al*., 1993) คุณภาพลูกกุ้งส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของกุ้งที่เลี้ยงในบ่อดิน แสดงให้เห็นว่าคุณภาพลูกกุ้งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการประสบความสำเร็จในการเลี้ยงกุ้ง (Samocha and Lawrence, 1992) และเพิ่มผลกำไรจากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบการเลี้ยง (Clirrord, 1992) นอกจากความสมบูรณ์แข็งแรงของลูกกุ้งแล้ว การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันในครัสตาเซีย การเปลี่ยนแปลงทางสิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดความเครียดและทำให้ความสมบูรณ์ของระบบภูมิคุ้มกันลดลง ซึ่งสามารถวัดได้จากค่า เม็ดเลือดรวม(Haemocyte count) การทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส (pro PO activation) ค่าความสามารถในการจับกินของเม็ดเลือด (phagocytic activity) และการปลดปล่อยอนุมูลอิสระของออกซิเจน (free oxygen radicals) ซึ่งถ้าระบบภูมิคุ้มกันของตัวกุ้งเปลี่ยนแปลงไปก็จะส่งให้สุขภาพไม่ดีทำให้ง่ายต่อการยอมรับต่อเชื้อได้ (Moullac and Haffner, 2000) Vargas-Albores และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาผลของความเค็มและอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของพลาสมาโปรตีน การทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งหางเหลือง *P. californiensis* โดยเลี้ยงกุ้งที่ความเค็มต่างๆ คือ 28 , 32 , 36 , 40 และ 44 ppt พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ทั้งสองค่าที่วัด และอีกการทดลองหนึ่งเลี้ยงกุ้งที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 12 , 22 ,25 ,28 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่า การทำงานของเอนไซม์โปรฟีนอลออกซิเดส ลดลงเมื่อเลี้ยงกุ้งที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และปริมาณความเข้มข้นของพลาสมาโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงกุ้งที่อุณหภูมิ 28 และ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่ออุณหภูมิและความเค็มเปลี่ยนแปลงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาและระบบภูมิคุ้มกันทำให้การยอมรับต่อเชื้อที่ง่ายขึ้น และทำให้ก่อโรคได้ ซึ่งปัจจัยที่เปลี่ยนแปลงเช่น เมื่ออุณหภูมิสูงทำให้เชื้อวิบริโอเจริญได้ดีด้วย ในขณะเดียวกันที่กุ้งมีร่างกายอ่อนแอเนื่องจากสภาวะเครียดก็ทำให้ยอมรับต่อเชื้อได้ง่ายกว่ากุ้งที่อยู่ในสภาวะปกติ (Hernandez-Lopez *et al*., 1995) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆด้วย (Prayitno and Latchford, 1995 ; Cheng and Chen, 2000 ; Cheng and Chen, 2002) เช่นเดียวกันในรายงานของ Cheng และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการจับกินของเม็ดเลือดและความ

สามารถในการกำจัดแบคทีเรีย *Lactococcus garvieae* ออกจากน้ำเลือด (clearance efficiency) ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่าค่าความสามารถในการจับกินที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 8 เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เท่ากับ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าดังกล่าวต่ำกว่าในชุดการทดลองที่ได้รับอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าความสามารถในการจับกิน 12 และ 13.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นว่ากุ้งที่ได้รับสภาวะเครียดที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส จะมีการยอมรับต่อ เชื้อ *L. garvieae* ได้ง่ายขึ้น เนื่องจากที่อุณหภูมินี้ทำให้เกิดสภาวะกดภูมิคุ้มกันในกุ้ง (immunosuppression)

5. การศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน

จากการศึกษาพยาธิสภาพของเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบการเปลี่ยนแปลงภายในนิวเคลียส โดยนิวคลีโอลัสเริ่มกระจัดกระจาย โครมาตินเคลื่อนที่ไปชิดขอบนิวเคลียส และไมโครวิลไล บรัสบอร์ดเดอร์หลุดออกจากเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ramasamy และคณะ (2000) ซึ่งศึกษาเซลล์บริเวณทางเดินอาหารที่ติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีพบว่าเส้นใยโครมาตินหดเล็กลงเป็นชิ้นเล็กลง และนิวคลีโอลัสกระจัดกรจายอยู่บริเวณขอบนิวเคลียส และบริเวณผิวหน้าเซลล์จะสูญเสียไมโครวิลไลไป และ Vogt (1992) ยังพบว่าเส้นใยโครมาตินจะถูกดันไปติดของนิวเคลียสเช่นกัน และในเซลลที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสดังกล่าว พบว่ายังมีก้อนไขมันภายในเซลล์ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (1989) รายงานว่า เซลล์อาร์ที่มีการติดเชื้อในระยะแรก จะพบว่ามีไขมัน 2-3 ก้อนภายในเซลล์ แต่เมื่อมีการพัฒนาระยะการติดเชื้อจะไม่พบก้อนไขมันภายในเซลล์ที่ติดเชื้อเลย ในขณะเดียวกันพบการเปลี่ยนแปลงของไมโตคอนเดรีย โดยมีรูปร่างผิดปกติไป เนื่องจากคริสตี (cristea) ที่อยู่ในไมโตคอนเดรียเกิดการบวมซึ่งน่าจะเป็นการติดเชื้อในระยะแรกๆเพราะยังไม่พบการเพิ่มจำนวนของอนุภาคไวรัสและการสร้างออกคลูชั่นบอดี จากรายงานของ Chen และคณะ (1989) ได้ศึกษาเปรียบเทียบเซลล์ตับและตับอ่อนที่ปกติและเซลล์ที่ติดเชื้อของกุ้งหางแดง (*P. penicillatus*) พบว่าจำนวนไมโตรคอนเดรียและกอลจิแอปพาราตัสมีจำนวนลดลง และส่วนของคริสตีในไมโตรคอนเดรียมีการบวมและเพิ่มจำนวนขึ้น นอกจากนี้แล้วการขยายใหญ่ของออกคลูชั่นบอดีจนมีการแตกสลายของเซลล์ทำให้ออกคลูชั่นบอดี และอนุภาคไวรัสกระจัดกระจายออกมานอกเซลล์ รวมทั้งองค์ประกอบเซลล์อื่นๆที่แตกสลายหลุดออกสู่ท่อตับและตับอ่อน ซึ่งจากพยาธิสภาพดังกล่าวทำให้ทราบว่าการติดเชื้อเข้าสู่ระยะที่ 4 โดยมีการเสื่อมสลายของเซลล์ และส่วนประกอบอื่นๆจะถูกปล่อยออกสู่ส่วนของช่องว่างที่เคยเป็บขอบเขตของเซลล์ที่ติดเชื้อ (Lu *et*

al., 1996) เมื่อดูภายในออกคลูชั่นบอดีที่กำลังขยาย 1.5 × 20,000 เท่า มีลักษณะเป็นร่างแห ภายในเต็มไปด้วยอนุภาคไวรัสรูปแท่ง และจะเห็นว่านอกจากจะพบอนุภาคไวรัสในส่วนออกคลูชั่นบอดีแล้วยังพบอนุภาคไวรัสอิสระที่กระจายตัวอยู่นอกออกคลูชั้นบอดีด้วย จากรายงานของ Bonami (1997)ได้ศึกษาความแตกต่างของโครงผลึกของโปรตีน (Crystalline structure) ในออกคลูชั่นบอดี พบว่าในกลุ่ม ไวรัสบีพี จะมีหน่วยย่อยเรียงกันในแนวขนาน ส่วนกลุ่มไวรัสเอ็มบีวีจะมีหน่วยย่อยเรียงกันเป็นวงคล้ายรูปดอกไม้ โดยมี 2 หน่วยย่อยที่ใช้ร่วมกับวงถัดไปกลายเป็นวงที่ต่อเนื่องกัน เมื่อพิจารณาจากภาพในผลการศึกษาพยาธิสภาพด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน จะเห็นว่าออกคลูชั่นบอดีมีลักษณะคล้ายหน่วยย่อยเรียงต่อกันเป็นร่างแหที่มีช่องว่างเป็นลักษณะกลม นอกจากนี้อนุภาคไวรัสที่พบภายในออกคลูชั่นบอดีเป็นรูปแท่ง เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Lu และคณะ (1995) และ Ramasamy และคณะ (1995) ซึ่งกล่าวว่าอนุภาคไวรัสมีลักษณะรูปแท่ง ประกอบด้วยผนังหุ้ม 1 ชั้น ขนาดของอนุภาคไวรัสมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 75 $\pm$ 4 นาโนเมตร และยาวประมาณ 324 $\pm$ 33 นาโนเมตร