

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อไวรัส เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส การก่อโรค และความรุนแรงของเชื้อ

3.1.1 การแยกเชื้อไวรัส

จากการนำเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ WSSV และเชื้อ YHV มาทำการตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธี PCR และ RT-PCR พบว่าให้ผลบวกอย่างชัดเจน และไม่มีการติดเชื้อร่วมของไวรัสทั้ง 2 จึงนำมาแยกเชื้อไวรัส และกรองผ่านเมมเบรนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรีย และใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

3.1.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

เมื่อนำเชื้อ WSSV มาฉีดแม่กุ้งกุลาดำขนาดเฉลี่ย 275 กรัม จำนวน 4 ตัว พบว่ากุ้งทดลองแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนในวันที่ 4 จึงเก็บเลือดกุ้งทั้งหมดในวันที่ 5 โดยเก็บตัวอย่างเลือดได้เฉลี่ยตัวละ 10 มิลลิลิตร หลังจากเจือจางเลือดกุ้งในอัตราเลือด 1 ส่วนและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 4 ส่วน และเก็บโดยแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -70°C องศาเซลเซียส นำเลือดกุ้งกุลาดำ 2 หลอด มาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ WSSV และ YHV โดยวิธี PCR และ RT-PCR ซึ่งตรวจพบผลเป็นบวกชัดเจนโดยไม่มีพบการปนเปื้อนของเชื้อ YHV พบเพียงเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองเพียงเล็กน้อย

ส่วนกุ้งกุลาดำขนาดเดียวกันที่ฉีดเชื้อ YHV พบว่ากุ้งแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนและไม่กินอาหารเลยในวันที่ 3 จึงเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 4 เมื่อนำตัวอย่าง 2 หลอด มาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อดังกล่าวด้วยวิธี RT-PCR ให้ผลเป็นบวก และให้ผลลบเมื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ WSSV แต่พบเลือดกุ้งมีเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนเล็กน้อย

กุ้งขนาดเดียวกันจำนวน 2 ตัวที่ไม่ได้ทำการฉีดเชื้อ ยังคงกินอาหารปกติ ไม่แสดงอาการติดโรคในระยะเวลา 10 วัน และไม่พบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด พบเพียงเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio เล็กน้อย

3.1.3 การก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัส

จากการนำสารละลายเชื้อ WSSV และเชื้อ YHV (ในข้อ 3.1.2) มาทดสอบความรุนแรงของโรคในกุ้งกุลาดำขนาด 4-6 กรัม พบว่าเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดทำให้กุ้งกุลาดำตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 15 วัน มีค่า LD_{50} 5.12×10^{-6} และ 1.5×10^{-9} สำหรับเชื้อ WSSV และ YHV ตามลำดับ

ผลการตรวจสอบไม่พบการติดเชื้อไวรัสรวมของทั้ง 2 ชนิด ในกึ่งทั้ง 2 ชุดการทดลอง แต่พบเชื้อแบคทีเรียในระดับบ้างเล็กน้อย และเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในกึ่งชุดควบคุมที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์และไม่มีกึ่งทดลองตายเลย

3.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ และการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัวกึ่ง

3.2.1 กึ่งกลาดำติดเชื้อ WSSV

การเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ WSSV โดยวิธีฉีดที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LD_{50} 200 เท่า (ชุดการทดลองที่ 1) ให้กึ่งกลาดำขนาด 4-6 กรัม พบว่ากึ่งเริ่มตายในวันที่ 2 หลังการฉีด และตายทั้งหมดภายใน 18 วัน ส่วนกึ่งทดลองที่ฉีดเชื้อไวรัสเจือจางต่ำกว่าค่า LD_{50} 1,000 เท่า (ชุดการทดลองที่ 2) พบกึ่งเริ่มตายเมื่อฉีดเชื้อ 2-3 วัน และมีอัตราการตายสูงสุดวันที่ 15 และลดลงเหลือวันละ 1-2 ตัว หลังวันที่ 21 ของการฉีดเชื้อ จนตลอดระยะ 45 วัน อัตรารอดตายของกึ่งทดลองหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ 25 วัน ประมาณ 26 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายประมาณ 78 เปอร์เซ็นต์

กึ่งทดลองที่ทำการฉีดเชื้อ WSSV เจือจาง 10,000 เท่า (ชุดการทดลองที่ 3) แสดงอาการติดเชื้อวันที่ 7 หลังการฉีด และทยอยตายอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 10-17 หลังจากวันที่ 21 ของการทดลองไม่พบการตายของกึ่งในชุดดังกล่าว โดยอัตราการรอดตายของกึ่งทดลองหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ 29 วัน ประมาณ 31 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายประมาณ 89 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 กึ่งกลาดำติดเชื้อ YHV

หลังฉีดเชื้อไวรัสดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LD_{50} 100,000 เท่า พบว่ากึ่งที่ได้รับเชื้อเริ่มตายวันที่ 3 และมีอัตราการตายสูงสุดในวันที่ 13-14 หลังฉีดเชื้อ จำนวนการตายลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีกึ่งตายติดต่อกัน 5 วัน ตั้งแต่วันที่ 22-26 หลังการฉีด โดยอัตราการรอดตายของกึ่งทดลองหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ 26 วัน ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมมีอัตราการรอดตายประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.3 การคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัวกึ่ง

3.2.3.1 การคงอยู่ของเชื้อ WSSV ในตัวกึ่งกลาดำ

เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV ของกึ่งกลาดำในชุดการทดลองที่ 2 พบว่าหลังจากการฉีดเชื้อ 7 14 21 35 และ 45 วัน ยังคงพบเชื้อไวรัสชนิดเดิมอยู่ทุกตัว (ตารางที่ 8) และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสอื่นในกึ่งชุดการทดลองและชุดควบคุม

ตารางที่ 8 การคงอยู่ของเชื้อ WSSV ในตัวกุ้งกุลาดำหลังจากเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ
นานต่างๆ กัน (ชุดการทดลองที่ 2)

Table 8 WSSV sustained in black tiger shrimp from different periods after WSSV infestation under
laboratory condition (Experiment 2).

Sampling	WSSV diagnostic PCR
Dead shrimp from day 2-21	100 % (10/10)*
Survivor from day 7	100 % (10/10)*
Survivor from day 14	100 % (10/10)*
Survivor from day 21	100 % (10/10)*
Survivor from day 28	100 % (10/10)*
Survivor from day 35	100 % (10/10)**
Survivor from day 45	100 % (10/10)**

* = Analyzed by 1 step PCR

** = Analyzed by nested PCR

Number of total sample/ Number of positive sample

ส่วนชุดการทดลองที่ 3 พบว่าหลังจากฉีดเชื้อ 2 วัน กุ้งมีการติดเชื้อ 100 เปอร์เซ็นต์ และ
ลดเหลือ 75 25 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ที่ 7 14 และ 21 วันตามลำดับ หลังจากนั้นตรวจไม่พบเชื้อ ไว
รัสในกุ้งชุดดังกล่าว (ตารางที่ 9) และไม่พบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสอื่นในกุ้งชุดทดลองและชุดควบ
คุมตลอดระยะเวลาการทดลอง

ตารางที่ 9 การคงอยู่ของเชื้อ WSSV ในตัวกุ้งกุลาดำหลังจากเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อในห้องปฏิบัติการนานต่างๆ กัน (ชุดการทดลองที่ 3)

Table 9 WSSV sustained in black tiger shrimp from difference periods after WSSV infestation under laboratory condition (Experiment 3).

Sample	WSSV diagnostic PCR
Dead shrimp from day 2-24	100 % (10/10)*
Survivor from day 7	100 % (6/6)**
Survivor from day 14	16.7 % (1/6)**
Survivor from day 21	0 % (0/6)**
Survivor from day 29	0 % (0/6)**
Survivor from day 43	0 % (0/6)**
Survivor from day 59	0 % (0/6)**

* = Analyzed by 1 step PCR

** = Analyzed by nested PCR

Number of total sample/ Number of positive sample

3.2.3.2 การคงอยู่ของเชื้อ YHV ในตัวกุ้งกุลาดำ

หลังฉีดเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LD_{50} 100,000 เท่า พบกุ้งที่ตายระหว่างวันที่ 4-21 ติดเชื้อ YHV 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กุ้งที่มีชีวิตในระยะเวลาเดียวกันยังมีเชื้อไวรัสชนิดเดิมอยู่ในตัว 80 เปอร์เซ็นต์ และผลการสุ่มตัวอย่างหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ 26 และ 32 วัน ตรวจพบกุ้งยังมีเชื้อไวรัสอยู่ในตัว 40 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นตรวจไม่พบการติดเชื้อไวรัสในตัวกุ้งรอดตายจากการสุ่มทุกๆ 14 วัน (ตารางที่ 10) ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส WSSV ในกุ้งชุดทดลอง และไม่พบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดในกุ้งชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลอง

ตารางที่ 10 การคงอยู่ของเชื้อ YHV ในตัวกุ้งกุลาดำหลังจากเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

นานต่างๆ กัน

Table 10 YHV sustained in black tiger shrimp from difference periods after YHV infestation under laboratory condition.

Sample	YHV diagnostic RT-PCR
Death shrimp from day 1-21	100 % (10/10)
Survivor from day 4-21	80 % (8/10)
Survivor from day 26	40 % (2/5)
Survivor from day 32	16.7 % (1/6)
Survivor from day 46	0 % (0/6)
Survivor from day 60	0 % (0/6)
Survivor from day 73	0 % (0/6)

Number of total sample/ Number of positive sample

3.3 กุ้งกุลาดำติดเชื้อ MBV/HPV

ตัวอย่างกุ้งกุลาดำอายุ 55 และ 60 วัน ในบ่อเลี้ยงของฟาร์มเอกชน อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา และ อำเภอหนองจิก จังหวัดปัตตานี จากการสอบถามพื้นที่ที่ทำการเลี้ยงทั้ง 2 แห่ง มีประวัติการระบาดของโรคติดเชื้อ WSSV มาก่อน ตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่นำมาทดลองมีขนาดแตกต่างกันชัดเจน โดยพบกุ้งกุลาดำที่เจริญเติบโตปกติมีขนาด 3.5-5 กรัม และกุ้งที่โตช้าซึ่งมีขนาด 1-2 กรัม กุ้งขนาดเล็กมีการตอบสนองต่อการกระตุ้น เช่นการติดตัวจากการยกยอหรือการสัมผัสปกติ แต่ลักษณะภายนอกของกุ้งดังกล่าวมีสีเข้มกว่า เช่นเดียวกับลักษณะของกุ้งทดลองอายุ 50 วัน ในบ่อเลี้ยงของสถานีวิจัยทางวิทยาศาสตร์ อำเภอละงู จังหวัดสตูล ที่พื้นที่การเลี้ยงไม่มีประวัติการระบาดของโรคไวรัสที่รุนแรงมาก่อน เมื่อสุ่มตัวอย่างกุ้งที่มีขนาดเล็กและใหญ่มาตรวจสอบการติดเชื้อ MBV/ HPV บริเวณตับและตับอ่อนโดยย้อมสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซิน พบกุ้งขนาดเล็กจากพื้นที่ต่างๆ ติดเชื้อ MBV/HPV ดังข้อมูลในตารางที่ 11 ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ WSSV และ YHV ในกุ้งทุกชุดการทดลอง

ตารางที่ 11 ผลการติดเชื้อ MBV/HPV บริเวณตับและตับอ่อนกึ่งกุลาคำจากพื้นที่ต่างๆ

Table 11 MBV/HPV infected in hepatopancreas of *Penaeus monodon* from different areas.

Sample source	MBV/HPV diagnostic*	
	Small	Normal
Songkhla	60 % (6/10)	0
Pattani	80 % (8/10)	0
Satun	70 % (7/10)	30% (3/10)

*Diagnosed by squash technique (Brock and Main, 1994)

Number of total sample/ Number of positive sample

3.4 ความสามารถในการต้านทานต่อโรคของกึ่งกุลาคำที่รอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ

3.4.1 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกึ่งกุลาคำที่รอดตายจากการติดเชื้อ WSSV

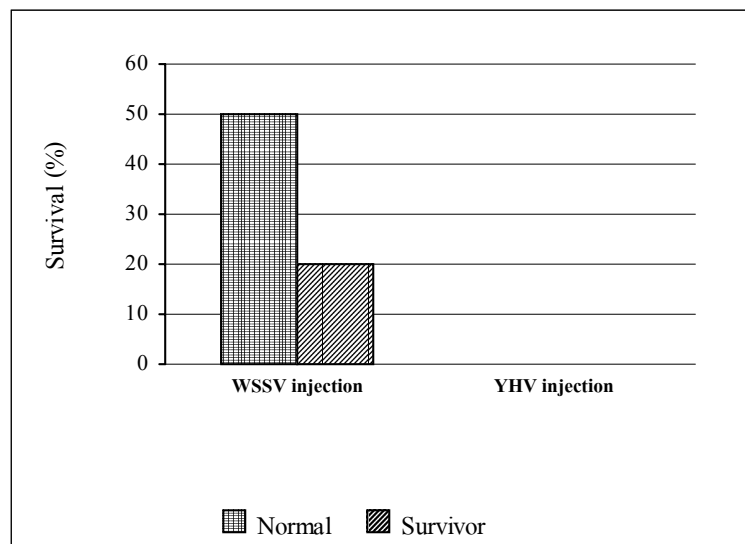
เมื่อนำกึ่งกุลาคำที่รอดตายจากการติดเชื้อ WSSV 25 วัน (ชุดการทดลองที่ 2) มาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัส ผลการทดลองพบกึ่งกุลาคำ และกึ่งชุดควบคุมไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อ YHV ที่ติดเชื้อ โดยกึ่งชุดควบคุมตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน และกึ่งกุลาคำที่รอดตายจากการติดเชื้อ WSSV ตายหมดภายใน 10 วัน ส่วนการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดเดิมเป็นระยะเวลา 15 วัน พบกึ่งกุลาคำที่รอดตายจากการติดเชื้อครั้งแรกมีอัตราการรอดตาย 20 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่ากึ่งกุลาคำชุดควบคุมที่มีอัตราการรอดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1)

เมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อไวรัสในกึ่งกุลาคำที่รอดตายหลังติดเชื้อครั้งแรกนาน 45 วัน พบว่าทั้งกึ่งกุลาคำที่รอดตายและกึ่งกุลาคำชุดควบคุมไม่มีความต้านทานต่อเชื้อ YHV เช่นเดียวกัน โดยกึ่งกุลาคำที่รอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 5 วัน ส่วนความต้านทานต่อเชื้อ WSSV ไม่พบความแตกต่างระหว่างชุดทดลองและชุดควบคุม เมื่อครบระยะเวลา 15 วัน โดยมีอัตราการรอดตาย 15 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน (ภาพที่ 2)

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกึ่งกุลาคำที่รอดตายหลังติดเชื้อครั้งแรก 29 วัน จากกึ่งชุดการทดลองที่ 3 ที่ตรวจไม่พบเชื้อคงอยู่ในตัวกึ่งก่อนนำมาเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อซ้ำโดยการฉีด พบว่ากึ่งชุดทดลองมีอัตราการรอดตาย 22 และ 6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำกึ่งกุลาคำที่ติดเชื้อซ้ำด้วยเชื้อ WSSV และ YHV ตามลำดับ ส่วนกึ่งชุดควบคุมมีอัตราการรอดตาย 32 เปอร์เซ็นต์ จากการฉีดซ้ำด้วยเชื้อ WSSV และไม่มีกึ่งกุลาคำที่รอดตายเมื่อนำกึ่งกุลาคำที่ติดเชื้อซ้ำด้วยเชื้อ YHV ส่วนกึ่งกุลาคำที่รอดตายจากการทดลองและกึ่งใน

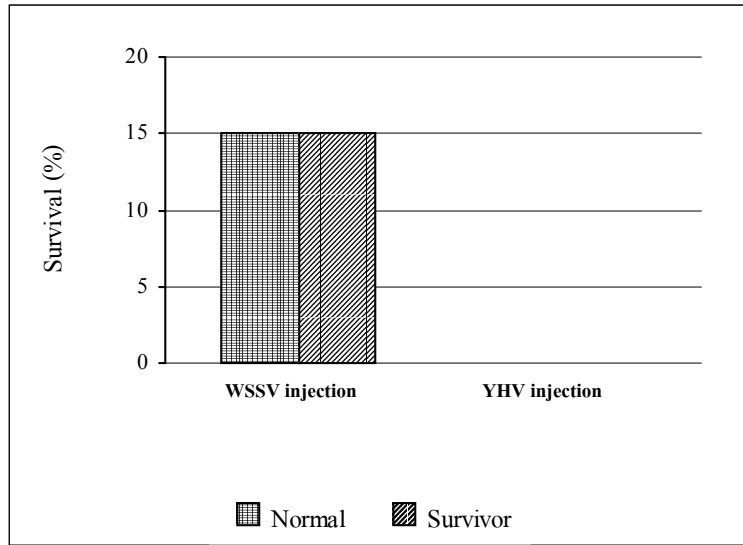
ชุดควบคุมที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนการฉีดเชื้อไวรัส มีอัตราการรอดตาย 100 และ 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)

สำหรับกึ่งรอดตาย 43 วันมีอัตราการรอดตาย 85 และ 75 เปอร์เซ็นต์ หลังการฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ตามลำดับ ในขณะที่กึ่งชุดควบคุมมีอัตราการรอดตาย 60 และ 55 เปอร์เซ็นต์ หลังการฉีดเชื้อเดียวกัน ส่วนกึ่งจากชุดการทดลองและชุดควบคุมที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนเชื้อไวรัสมีอัตราการรอดตาย 90 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน (ภาพที่ 4) สำหรับกึ่งรอดตายหลังจากติดเชื้อครั้งแรก 57 วัน มีอัตราการรอดตายหลังจากติดเชื้อเดิมซ้ำ 12 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการรอดตายเมื่อฉีดเชื้อ YHV 7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมมีอัตราการรอดตาย 20 และ 60 เปอร์เซ็นต์ หลังการฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำเป็นระยะเวลา 15 วัน ส่วนกึ่งชุดทดลองและชุดควบคุมที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีอัตราการรอดตาย 85 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5)



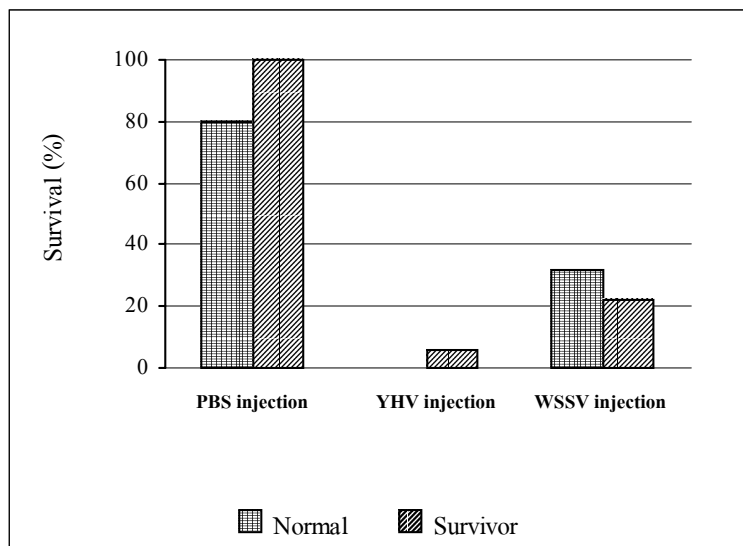
ภาพที่ 1 อัตราการรอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกึ่งกุลาดำปกติและกึ่งรอดตาย ที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV 25 วัน (ชุดการทดลองที่ 2)

Figure1 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 25 day of WSSV injection (Experiment 2).



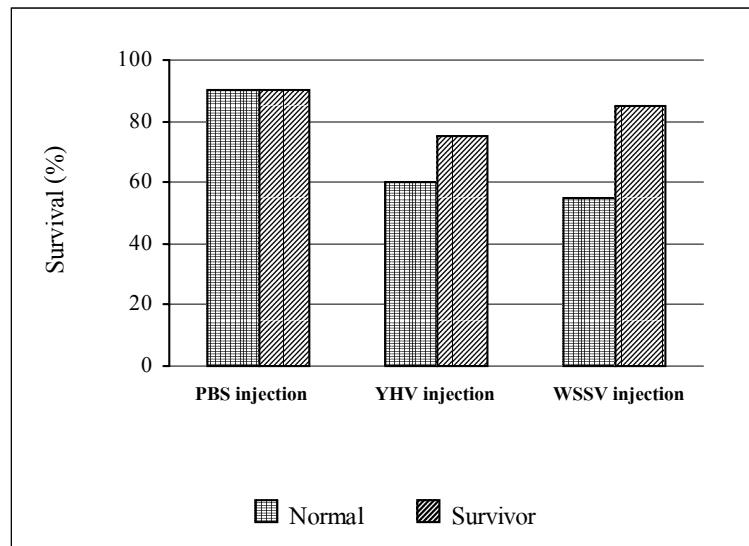
ภาพที่ 2 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตาย ที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV 45 วัน (ชุดการทดลองที่ 2)

Figure 2 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 45 day of WSSV injection (Experiment 2).



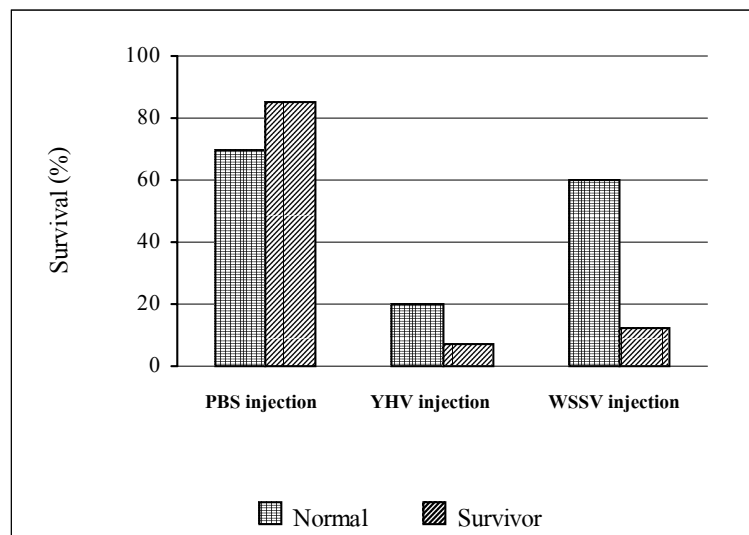
ภาพที่ 3 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตาย ที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV 29 วัน (ชุดการทดลองที่ 3)

Figure 3 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 29 day of WSSV injection (Experiment 3).



ภาพที่ 4 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตาย ที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV 43 วัน (ชุดการทดลองที่ 3)

Figure 4 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 43 day of WSSV injection (Experiment 3).



ภาพที่ 5 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตาย ที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV 57 วัน (ชุดการทดลองที่ 3)

Figure 5 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 57 day of WSSV injection (Experiment 3).

เมื่อคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรค (Relative percent survival, RPS) ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการติดเชื้อไวรัสซ้า พบว่ากุ้งที่รอดตายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ WSSV 29 และ 57 วัน ไม่มีประสิทธิภาพในการต้านต่อเชื้อไวรัสชนิดเดิม แต่ที่รอดตายนาน 43 วัน มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อเดิมถึง 67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อ YHV ของกุ้งรอดตายชุดเดียวกัน พบว่าหลังติดเชื้อครั้งแรกนาน 29 และ 43 57 วัน กุ้งมีประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อ YHV ซึ่งต่างชนิดกับเชื้อที่กุ้งได้รับครั้งแรกเพียง 6 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพการต้านทานต่อเชื้อ WSSV และ YHV ของกุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำ

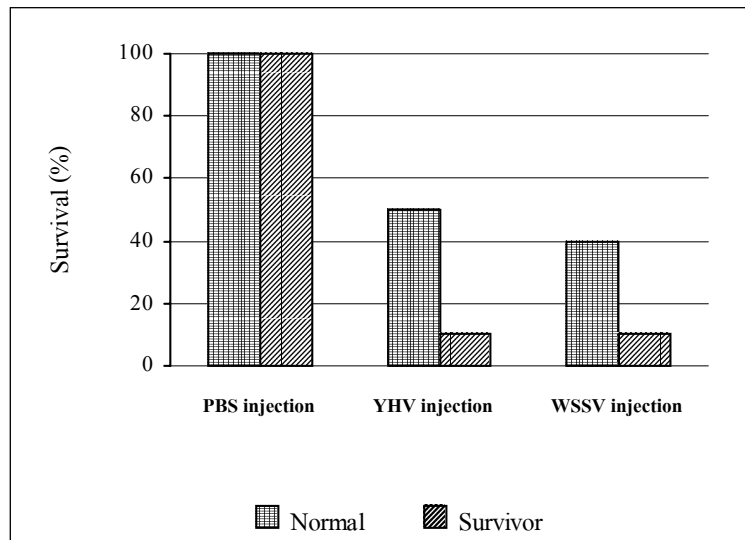
ให้ติดเชื้อ WSSV ในห้องปฏิบัติการ

Table 12 Relative percent survival against WSSV and YHV of survivors induced by WSSV under laboratory condition.

Survivor after infection with WSSV (day)	Re-challenging of virus	% RPS
29	WSSV	-14.7
43	WSSV	67.0
57	WSSV	-105.0
29	YHV	6.0
43	YHV	37.5
57	YHV	-16.3

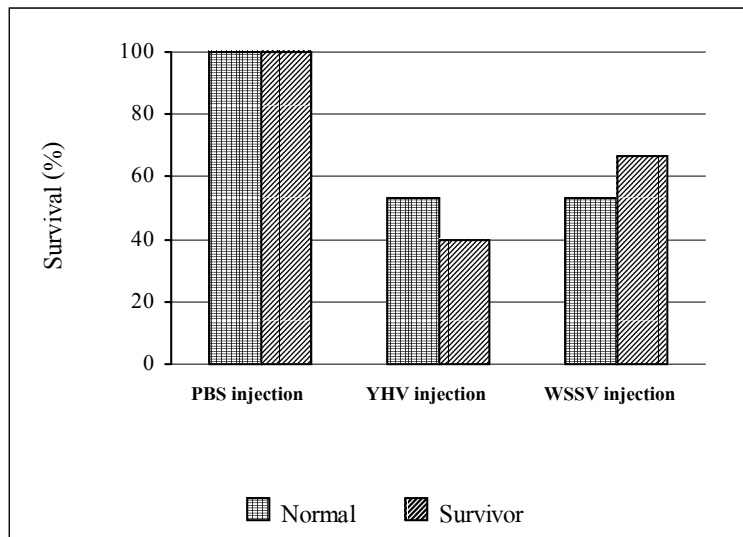
3.4.2 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกุ้งรอดตายจากการติดเชื้อ YHV

เมื่อนำกุ้งรอดตายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ YHV ในห้องปฏิบัติการ มาทำการติดเชื้อไวรัสชนิดเดิมและเชื้อ WSSV ซ้ำ พบกุ้งรอดตาย 26 วัน ไม่มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 6) สำหรับกุ้งรอดตาย 32 วัน สามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ 66.7 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าชุดควบคุมที่ติดเชื้อเดียวกันซ้ำ มีอัตราการรอดตาย 53.3 เปอร์เซ็นต์ และพบกุ้งชุดดังกล่าวต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดเดิมที่ติดซ้ำได้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าชุดควบคุมที่มีอัตราการรอดตาย 53.3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7) เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรคของกุ้งรอดตาย 46 วัน พบให้ผลเช่นเดียวกับครั้งที่ 2 (32 วัน) โดยกุ้งรอดตายต้านทานต่อเชื้อ WSSV 67 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากุ้งชุดควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดตาย 47 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8) กุ้งรอดตาย 60 วัน มีอัตราการรอดตายเมื่อติดเชื้อ WSSV 42.9 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่ากุ้งชุดควบคุมที่กุ้งมีอัตราการรอดตาย 46.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งรอดตาย 73 วันมีอัตราการรอดตายเมื่อติดเชื้อ WSSV ซ้ำเท่ากับกุ้งในชุดควบคุม 12.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบกุ้งรอดตาย 60 วัน มีอัตราการรอดตายถึง 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฉีดด้วยเชื้อชนิดเดิมซ้ำ สูงกว่าชุดควบคุมที่มีอัตราการรอดตายเพียง 33.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ 73 วัน มีอัตราการรอดตาย 9.5 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีกุ้งรอดตายเลย (ภาพที่ 9 และ 10)



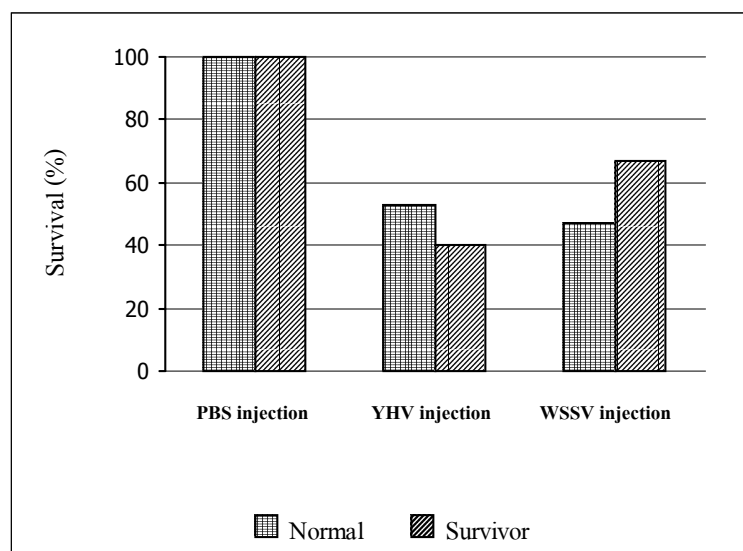
ภาพที่ 6 ที่อัตราการรอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตายผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV 26 วัน

Figure 6 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 26 day of YHV injection.



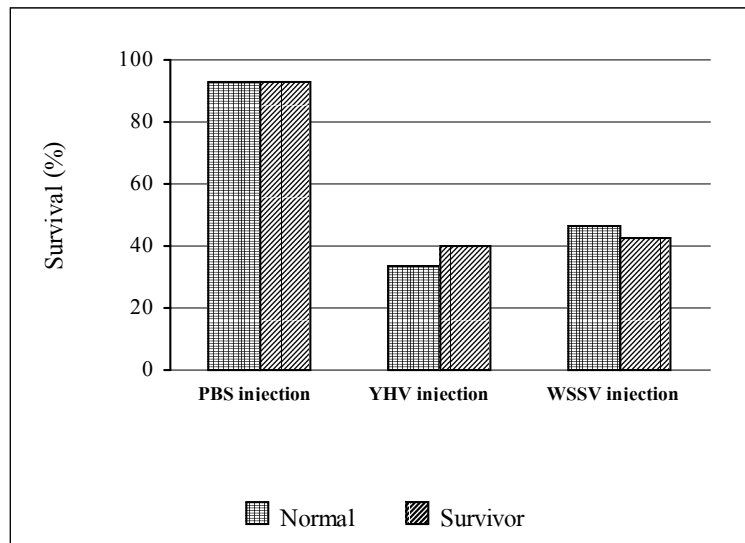
ภาพที่ 7 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตาย ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV 32 วัน

Figure 7 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 32 day of YHV injection.



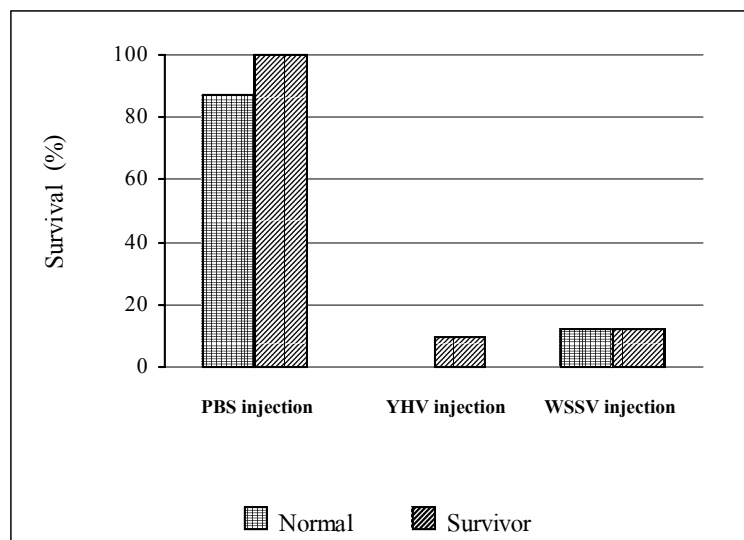
ภาพที่ 8 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตาย ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV 46 วัน

Figure 8 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 46 day of YHV injection.



ภาพที่ 9 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตาย ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV 60 วัน

Figure 9 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 60 day of YHV injection.



ภาพที่ 10 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตาย ที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV 73 วัน

Figure 10 Survival rate after re-challenge by WSSV and YHV of normal and survivor after a period of 73 day of YHV injection.

เมื่อคำนวณหาค่าประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรคในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการทดลองฉีดเชื้อไวรัสซ้ำ พบว่ากุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ YHV 26 60 และ 73 วันไม่มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อโรค WSSV ในขณะที่กุ้งรอดตาย 32 และ 46 วัน มีค่า RPS ต่อเชื้อ WSSV คิดเป็น 28.6 และ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับค่า RPS ต่อเชื้อเดิมพบว่าที่ 26 และ 32 วัน กุ้งรอดตายไม่มีประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อเดียวกันที่ฉีดซ้ำ แต่หลังรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ 46 60 และ 73 วัน กุ้งรอดตายมีประสิทธิภาพในการต้านต่อเชื้อชนิดเดิม 10 12.1 และ 9.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

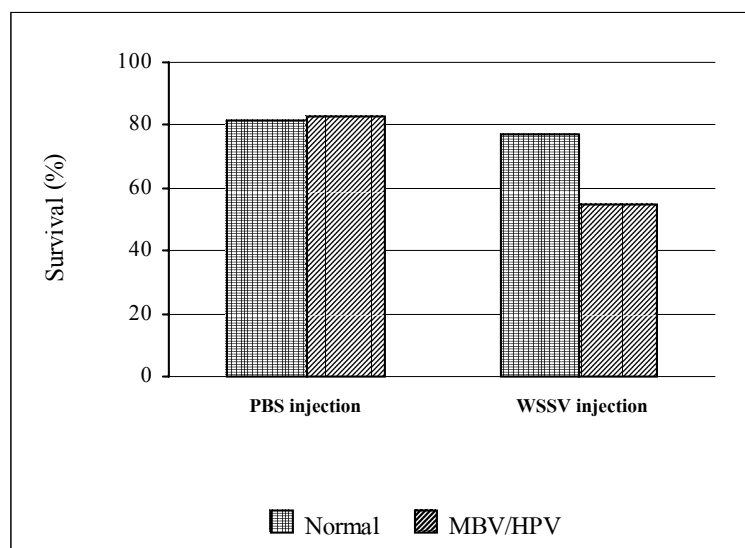
ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพการต้านทานต่อเชื้อ WSSV และ YHV ของกุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV ในห้องปฏิบัติการ

Table 13 Relative percent survival (RPS) against WSSV and YHV of survivors induced by YHV under laboratory condition.

Time after infection with YHV (day)	Re-challenging of virus	% RPS
26	WSSV	-50.0
32	WSSV	28.6
46	WSSV	37.5
60	WSSV	-9.9
73	WSSV	-12.5
26	YHV	-80.0
32	YHV	-28.6
46	YHV	10.0
60	YHV	12.1
73	YHV	9.5

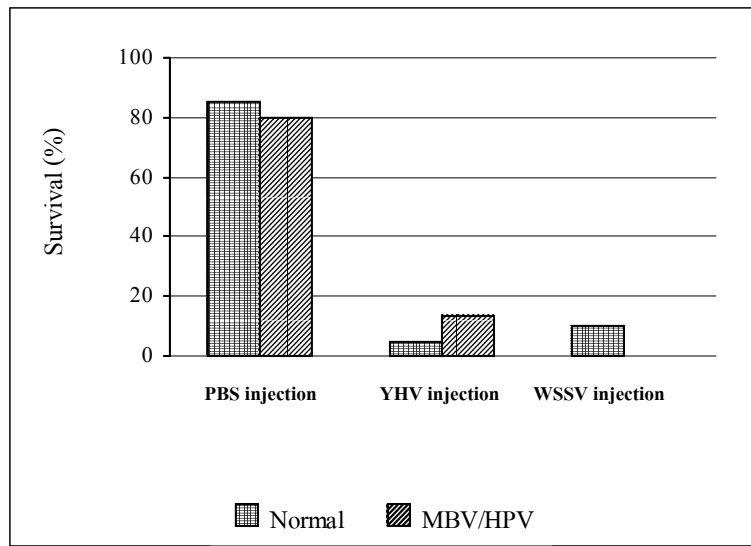
3.4.3 ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกุ้งที่ติดเชื้อ MBV/HPV

เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรค WSSV และ YHV ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ MBV/HPV จากจังหวัดสงขลา พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อมีอัตราการรอดตายหลังจากฉีดเชื้อ WSSV 54.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งปกติที่ติดเชื้อเดียวกันมีอัตราการรอดตาย 77.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งทั้ง 2 ชุดที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์แทนเชื้อไวรัสอัตราการรอดตาย 82.7 และ 81.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 11) กุ้งติดเชื้อจากจังหวัดปัตตานี เมื่อนำมาฉีดเชื้อ WSSV ซ้ำ พบว่ากุ้งมีความสามารถต้านทานต่อโรคนี้นี้ต่ำกว่ากุ้งปกติโดยไม่มีกุ้งรอดตายเลย ในขณะที่กุ้งปกติมีอัตราการรอดตาย 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำกุ้งชุดเดียวกันมาฉีดเชื้อ YHV พบว่ากุ้งติดเชื้อ MBV/HPV มีอัตราการรอดตาย 13.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งปกติมีอัตราการรอดตาย 5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งที่ติดเชื้อและกุ้งปกติที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์มีอัตราการรอดตาย 80 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 12) สำหรับกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ MBV/HPV จากสตูลมีอัตราการรอดตาย 15.0 และ 78.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งปกติมีอัตราการรอดตาย 23.8, 10.5 และ 90.9 เปอร์เซ็นต์ หลังการฉีดเชื้อ WSSV, YHV และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 13)



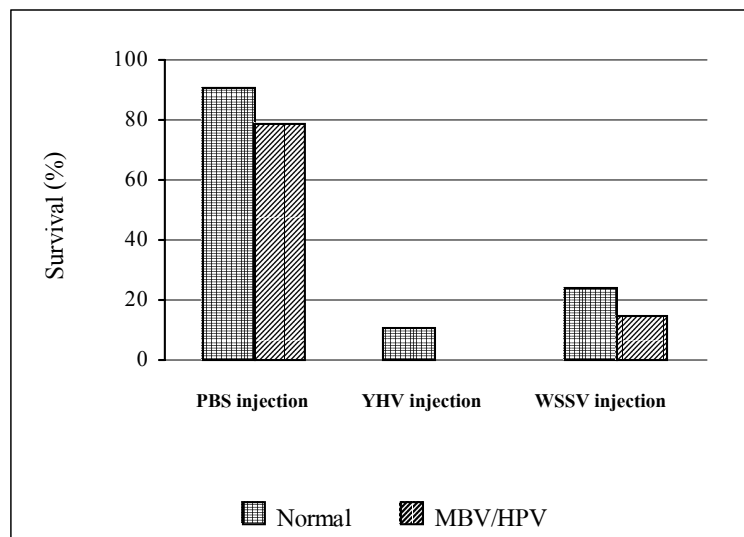
ภาพที่ 11 อัตราการรอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งติดเชื้อ MBV/HPV จากจังหวัดสงขลา

Figure 11 Survival rate after re-challenge with WSSV of normal and MBV/HPV infected shrimp from Songkhla province.



ภาพที่ 12 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งติดเชื้อ MBV/HPV จากจังหวัดปัตตานี

Figure 12 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and MBV/HPV infected shrimp from Pattani province.



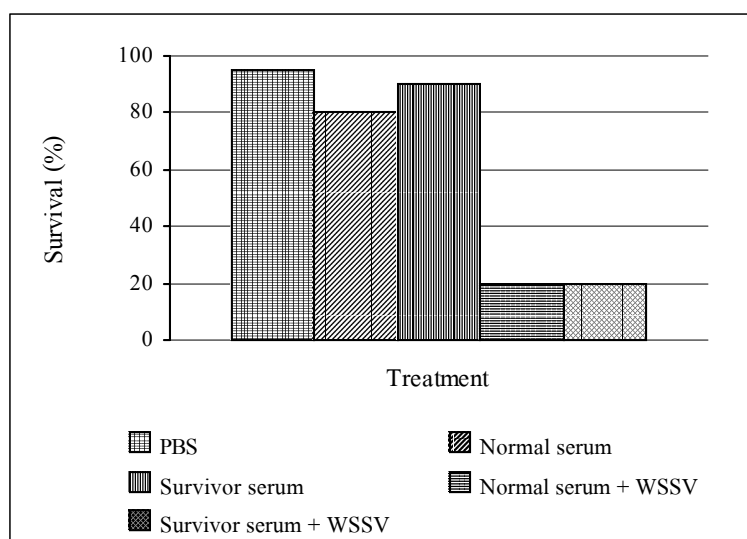
ภาพที่ 13 อัตรารอดตายหลังการติดเชื้อ WSSV และ YHV ซ้ำ ของกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งติดเชื้อ MBV/HPV จากจังหวัดสตูล

Figure 13 Survival rate after re-challenge with WSSV and YHV of normal and MBV/HPV infected shrimp from Satun province.

3.5 ปฏิบัติการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดกุ้งรอดตาย (Neutralization test)

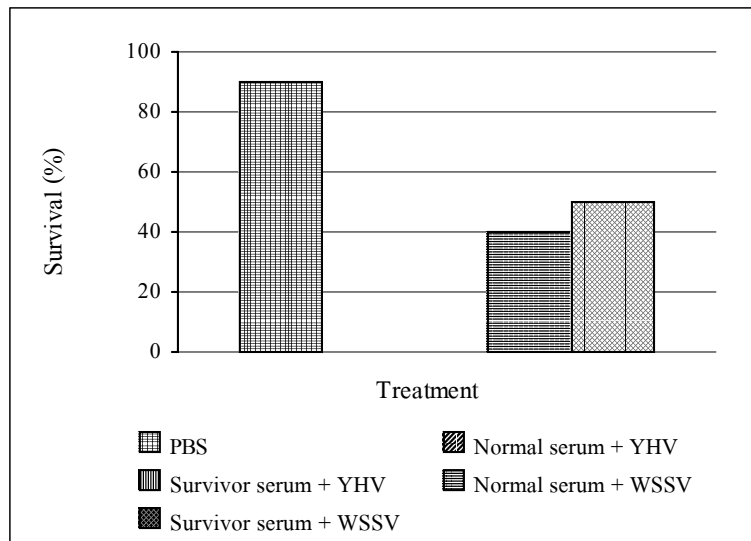
3.5.1 การลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV

เมื่อนำน้ำเลือดกุ้งกุลาดำรอดตายหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 45 วัน (ชุดการทดลองที่ 2) ผสมกับเชื้อไวรัสชนิดเดิม แล้วฉีดเข้ากุ้งกุลาดำปกติ เปรียบเทียบกับการใช้น้ำเลือดกุ้งปกติ ผสมเชื้อไวรัส ผลการทดลองพบว่าน้ำเลือดจากกุ้งรอดตายและกุ้งปกติ มีผลลดปริมาณเชื้อ WSSV ได้ไม่แตกต่างกัน โดยหลังการทดลองกุ้งมีอัตราการรอดตาย 20 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน สำหรับกุ้งชุดเดียวกันที่ฉีดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ น้ำเลือดกุ้งปกติ และน้ำเลือดกุ้งรอดตายที่ไม่ผสมกับเชื้อไวรัสมีอัตราการรอดตาย 95 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 14) สำหรับน้ำเลือดกุ้งกุลาดำรอดตายหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 43 วัน (จากชุดการทดลองที่ 3) เมื่อนำมาผสมกับเชื้อชนิดเดิมแล้วฉีดเข้ากุ้งปกติ พบกุ้งมีอัตราการรอดตาย 50 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่ากุ้งชุดที่ได้รับเชื้อไวรัสผสมกับน้ำเลือดกุ้งปกติ ที่มีอัตราการรอดตายเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีกุ้งรอดตายเลยเมื่อฉีดด้วยสารละลายเชื้อ YHV ที่ผสมกับน้ำเลือดกุ้งปกติ และน้ำเลือดกุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV มาก่อน ในขณะที่เมื่อฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์กุ้งมีอัตราการรอดตาย 90 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 14 อัตราการรอดตายของกุ้งกุลาดำปกติหลังฉีดเชื้อ WSSV ที่ทดสอบการลบล้างฤทธิ์ด้วยน้ำเลือดกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV 45 วัน (ชุดการทดลองที่ 2)

Figure 14 Survival rate of normal shrimp after challenge by WSSV neutralized by survivors' serum from a period of 45 day of WSSV injection (Experiment 2).

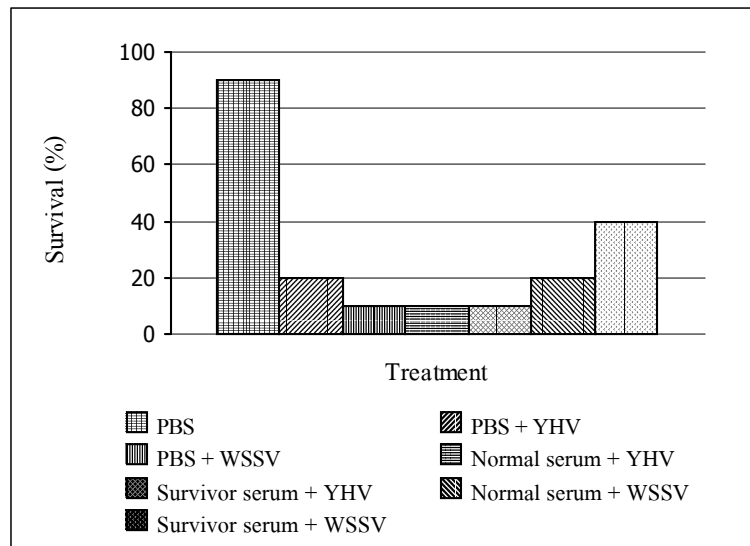


ภาพที่ 15 อัตรารอดตายของกุ้งกุลาดำปกติหลังฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ที่ทดสอบการบล้างฤทธิ์ด้วยน้ำเลือดกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV 43 วัน (ชุดการทดลองที่ 2)

Figure 15 Survival rate of normal shrimp after challenge by WSSV and YHV neutralized by survivors' serum from a period of 43 day of WSSV injection (Experiment 3).

3.5.2 การบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ YHV

เมื่อนำน้ำเลือดกุ้งกุลาดำมาผสมกับเชื้อ YHV และ WSSV แล้วนำไปฉีดเข้ากุ้งกุลาดำปกติ พบน้ำเลือดกุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV มาก่อนสามารถบล้างเชื้อไวรัสได้ โดยหลังฉีดน้ำเลือดกุ้งรอดตายที่ผสมเชื้อ WSSV กุ้งมีอัตราการรอดตาย 40 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าชุดที่ฉีดด้วยน้ำเลือดกุ้งปกติผสมเชื้อเดียวกันที่อัตราการรอดตายของกุ้งเหลือเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราการรอดตายของกุ้งปกติที่ฉีดด้วยน้ำเลือดกุ้งรอดตายผสมเชื้อ YHV และน้ำเลือดกุ้งปกติผสมเชื้อเดียวกันมีค่าเท่ากัน 10 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดตายของกุ้งที่ฉีดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ผสมเชื้อ WSSV และ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ผสมเชื้อ YHV มีค่า 90 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 16)



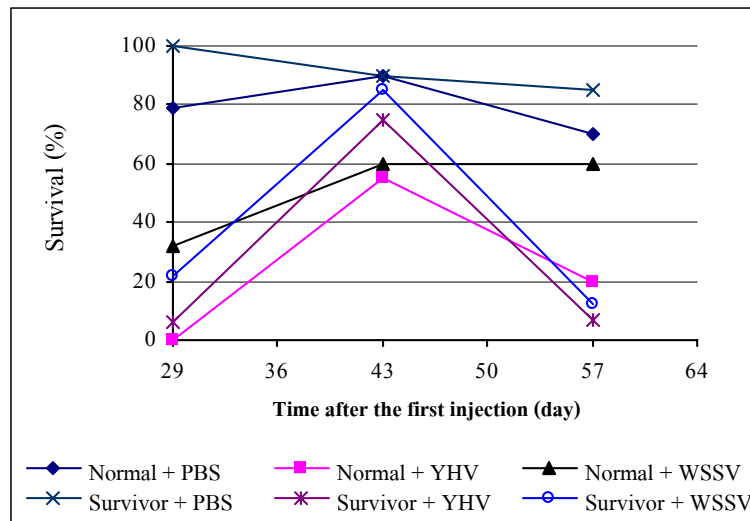
ภาพที่ 16 อัตรารอดตายของกุ้งกุลาดำปกติหลังฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ที่ทดสอบการหลบเลี่ยงฤทธิ์ด้วยน้ำเลือดกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ YHV 46 วัน

Figure 16 Survival rate of normal shrimp after challenge by WSSV and YHV neutralized by survivors' serum from a period of 46 day of YHV injection.

3.6 ผลของระยะเวลาต่อความสามารถในการต้านทานโรคไวรัสของกุ้งรอดตาย

3.6.1 ระยะเวลาต่อความสามารถต้านทานโรคไวรัสของกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV

เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสของกุ้งที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ WSSV มาก่อนเป็นระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่าหลังกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ WSSV 29 วัน มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อเดิมได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยด้วยอัตราการรอดตาย 22 เปอร์เซ็นต์ และสามารถต้านทานต่อเชื้อเดิมเพิ่มขึ้นสูงสุดโดยมีอัตราการรอดตาย 85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากติดเชื้อนาน 43 วัน และความสามารถลดลงเหลือ 12 เปอร์เซ็นต์ ที่ 57 วัน เช่นเดียวกับความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ YHV ที่กุ้งรอดตาย 29 43 และ 57 วัน มีอัตราการรอดตายหลังฉีดเชื้อดังกล่าวซ้ำ 0 60 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 17)

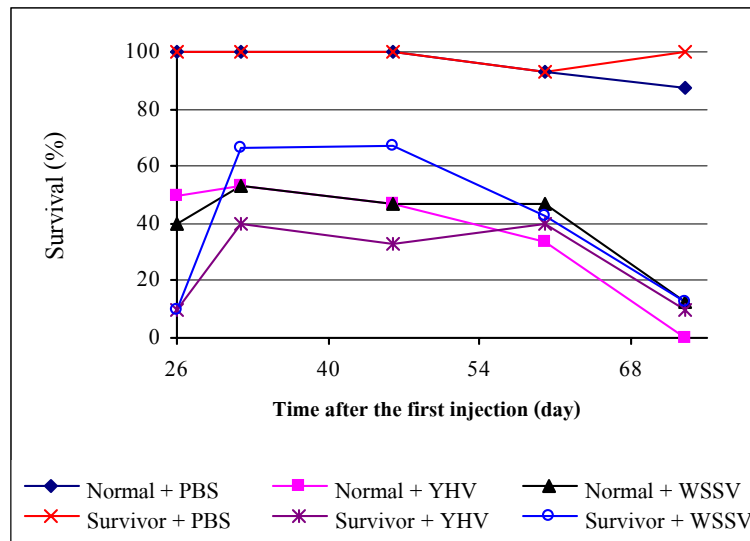


ภาพที่ 17 ความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสซ้ำของกุ้งปกติและกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV ในห้องปฏิบัติการนาน 29 43 และ 57 วัน

Figure 17 The capability against re-challenging viruses in normal and survivor from WSSV induced under laboratory condition for 29, 43 and 57 days.

3.6.2 ระยะเวลาต่อความสามารถต้านทานโรคไวรัสของกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ YHV

ผลการทดลองพบว่ากุ้งกุลาดำรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV 26 วัน มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยทำให้กุ้งต้านทานต่อเชื้อ WSSV และ YHV ด้วยอัตราการรอดตาย 10 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน หลังจากนั้นความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ WSSV ของกุ้งรอดตายมีค่าสูงขึ้นโดยมีอัตราการรอดตาย 66.7 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ที่ 32 และ 46 วัน แล้วลดลงเหลือ 42.9 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ หลังรอดตาย 60 และ 73 วัน ส่วนความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อเดิมพบกุ้งมีอัตราการรอดตายเพิ่มขึ้นเป็น 40 33 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ที่ 32 46 และ 60 วัน หลังจากนั้นลดลงเหลือ 9.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 73 วัน (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 ความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสซ้ำของกุ้งปกติ และกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ YHV ในห้องปฏิบัติการนาน 26 32 46 60 และ 70 วัน

Figure 18 The capability against re-challenging viruses in normal and survivor from YHV induced under laboratory condition for 26, 32, 46, 60 and 73 days.

3.7 องค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำ

3.8.1 องค์ประกอบเลือดกุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV

กุ้งกุลาดำที่ถูกเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 18 วัน (ชุดการทดลองที่ 1) มีปริมาณเม็ดเลือด กลูโคสในเลือด โปรตีนในซีรัม และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เท่ากับ 0.34 ± 0.23 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร 13.13 ± 15.06 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ 57.87 ± 14.22 มิลลิกรัม/มิลลิเมตร และ 83.10 ± 90.37 ยูนิต/นาทีก/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ต่ำกว่ากุ้งควบคุมที่มีปริมาณเม็ดเลือดรวม 6.63 ± 2.46 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร กลูโคสในเลือด 77.24 ± 41.56 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ โปรตีนในซีรัม 93.47 ± 35.83 มิลลิกรัม/มิลลิเมตร และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 485.49 ± 178.44 ยูนิต/นาทีก/มิลลิกรัมโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 14)

สำหรับกุ้งกุลาดำรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 25 และ 45 วัน (ชุดการทดลองที่ 2) พบองค์ประกอบเลือดต่างๆไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกุ้งชุดทดลองและชุดควบคุมที่เวลาเดียวกัน (ตารางที่ 15)

ผลขององค์ประกอบเลือดกุ้งรอดตายเทียบกับกุ้งปกติในชุดการทดลองที่ 3 พบเลือดกุ้งปกติและกุ้งรอดตายหลังเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 29 วันมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่กุ้งรอดตาย 43 วัน มีปริมาณของกลูโคสในเลือด และ กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ

72.88 ± 47.12 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และ 445.12 ± 120.49 ยูนิต/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่า 32.22 ± 17.49 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และ 324.41 ± 146.86 ยูนิต/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ส่วนปริมาณทองแดงในซีรัมกุ้งรอดตาย 57 วันมีค่า 158.96 ± 42.46 มิลลิกรัม/ลิตร สูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่า 120.46 ± 24.70 มิลลิกรัม/ลิตร แต่ระดับกลูโคสในเลือดของกุ้งรอดตายมีค่า 33.21 ± 13.67 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าเลือดกุ้งปกติที่มีค่า 45.47 ± 9.02 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ส่วนองค์ประกอบเลือดอื่นไม่พบความแตกต่างระหว่าง 2 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 14 องค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV ในห้องปฏิบัติการ (ชุดการทดลองที่ 1*)

Table 14 Blood parameters in normal and WSSV-infected shrimps (Experiment 1*).

Parameters	Sample	
	Control	Survivor
THC ($\times 10^4$ cell/mm ³)	6.63 ± 2.46 ^a	0.34 ± 0.23 ^b
Blood glucose (mg%)	77.24 ± 41.56 ^a	13.13 ± 15.06 ^b
Serum protein (mg/ml)	93.47 ± 35.83 ^a	57.87 ± 14.22 ^b
PO activity (unit/min/mg prot)	485.49 ± 178.44 ^a	83.10 ± 90.37 ^b

* Sample collected from moribund shrimp after injection with WSSV for 18 day.

Means ± SD. Values in the same row sharing a common superscript are not statistically different (p>0.05).

n = 30

ตารางที่ 15 องค์ประกอบเลือดกึ่งกลูตาดีปคิตและกึ่งรอดตายที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV นานต่างกัน (ชุดการทดลองที่ 2)

Table 15 Blood parameters of normal and WSSV-induced survivor from different period of infestation (Experiment 2).

Parameters	Sample from day 25		Sample from day 45	
	Control	Survivor	Control	Survivor
Total haemocyte count ($\times 10^4$ cell/mm ³)*	5.76 \pm 2.38 ^a	4.16 \pm 1.91 ^a	2.73 \pm 2.11 ^a	4.68 \pm 2.90 ^a
Blood glucose (mg%)*	26.98 \pm 9.05 ^a	29.69 \pm 10.89 ^a	43.42 \pm 31.08 ^a	44.10 \pm 19.56 ^a
Serum protein (mg/ml)*	73.81 \pm 26.46 ^a	75.24 \pm 23.08 ^a	79.18 \pm 36.95 ^a	78.43 \pm 29.78 ^a
Copper (mg/L)**	132.80 \pm 46.40 ^a	139.70 \pm 40.90 ^a	91.50 \pm 51.50 ^a	111.10 \pm 46.30 ^a
PO activity (unit/min/mg prot.)*	678.06 \pm 226.41 ^a	712.77 \pm 511.38 ^a	203.81 \pm 119.93 ^a	263.14 \pm 182.89 ^a

Means \pm SD. Values in the same row sharing a common superscript are not statistically different ($p > 0.05$).

* n = 30

** n = 20

ตารางที่ 16 องค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำปกติและกุ้งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ WSSV นานต่างกัน (ชุดการทดลองที่ 3)

Table 16 Blood parameters of normal and WSSV-induced survivor from different period of infestation (Experiment 3).

Parameters	Sample from day 29		Sample from day 43		Sample from day 57	
	Control	Survivor	Control	Survivor	Control	Survivor
Total haemocyte count ($\times 10^4$ cell/mm ³)	4.38 \pm 3.95 ^a (15)	5.49 \pm 2.55 ^a (14)	3.69 \pm 2.09 ^a (13)	4.90 \pm 2.07 ^a (12)	5.82 \pm 1.43 ^a (15)	4.83 \pm 2.83 ^a (12)
Blood glucose (mg%)	28.32 \pm 11.70 ^a (12)	19.25 \pm 11.29 ^a (12)	32.22 \pm 17.49 ^b (12)	72.88 \pm 47.12 ^a (12)	45.47 \pm 9.02 ^a (15)	33.21 \pm 13.67 ^b (15)
Serum protein (mg/ml)	120.25 \pm 30.32 ^a (15)	97.79 \pm 43.82 ^a (13)	125.71 \pm 26.57 ^a (14)	120.69 \pm 31.99 ^a (13)	86.62 \pm 17.57 ^a (15)	97.18 \pm 28.19 ^a (15)
Copper (mg/L)	123.37 \pm 41.65 ^a (10)	82.01 \pm 62.09 ^a (8)	188.25 \pm 31.49 ^a (9)	182.27 \pm 37.71 ^a (9)	120.46 \pm 24.70 ^b (10)	158.96 \pm 42.46 ^a (8)
PO activity (unit/min/mg prot.)	195.62 \pm 98.19 ^a (12)	208.37 \pm 127.20 ^a (12)	324.41 \pm 146.86 ^b (12)	445.12 \pm 20.49 ^a (12)	420.57 \pm 57.21 ^a (13)	430.97 \pm 172.34 ^a (11)

Means \pm SD. Values in the same row sharing a common superscript are not statistically different ($p > 0.05$).

Value in parentheses = n

3.8.2 องค์ประกอบเลือดกึ่งรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ YHV

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดกึ่งกลาดำรอดตายที่ผ่านการติดเชื้อ YHV 32 46 และ 60 วัน เทียบกับเลือดกึ่งปกติในชุดควบคุม พบว่าปริมาณกลูโคสในเลือด โปรตีนและทองแดงในซีรัม รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เว้นแต่ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกึ่งรอดตาย 46 วัน มีค่า 9.30 ± 1.84 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร สูงกว่ากึ่งปกติในชุดควบคุมที่มีค่า 6.32 ± 1.63 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 องค์ประกอบเลือดกึ่งกลาดำปกติและกึ่งรอดตายที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV นานต่างกัน

Table 17 Blood parameters of normal and YHV induced survivor from different period of infestation.

Parameters	Sample from day 32		Sample from day 46		Sample from day 60	
	Control	Survivor	Control	Survivor	Control	Survivor
Total haemocyte count ($\times 10^4$ cell/mm ³)	6.87 \pm 1.81 ^a (14)	6.52 \pm 2.26 ^a (14)	6.32 \pm 1.63 ^a (14)	9.30 \pm 1.84 ^b (11)	6.37 \pm 2.60 ^a (13)	7.51 \pm 1.87 ^a (13)
Blood glucose (mg%)	34.76 \pm 14.08 ^a (15)	38.61 \pm 11.24 ^a (15)	40.20 \pm 13.30 ^a (12)	37.71 \pm 7.56 ^a (14)	41.29 \pm 26.26 ^a (13)	47.57 \pm 12.99 ^a (13)
Serum protein (mg/ml)	120.86 \pm 25.33 ^a (16)	124.55 \pm 28.65 ^a (15)	95.14 \pm 29.84 ^a (15)	99.97 \pm 22.68 ^a (15)	120.86 \pm 25.33 ^a (18)	125.77 \pm 41.76 ^a (15)
Copper (mg/L)	157.16 \pm 41.93 ^a (10)	157.90 \pm 30.14 ^a (10)	163.65 \pm 29.66 ^a (10)	154.60 \pm 25.66 ^a (10)	167.77 \pm 42.48 ^a (9)	162.31 \pm 19.99 ^a (10)
PO activity (unit/min/mg prot.)	237.82 \pm 93.36 ^a (10)	260.92 \pm 80.09 ^a (10)	664.01 \pm 110.37 ^a (10)	754.88 \pm 135.52 ^a (10)	360.61 \pm 76.56 ^a (14)	291.88 \pm 74.99 ^a (14)

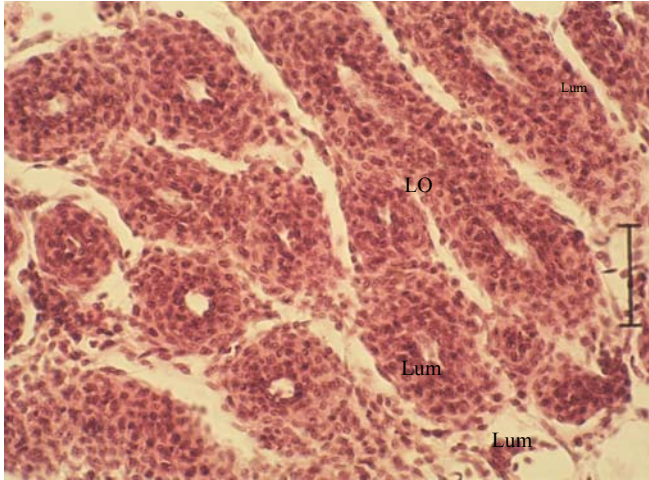
Means \pm SD. Values in the same row sharing a common superscript are not statistically different ($p > 0.05$).

Value in parentheses = n

3.8 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อถุงกูดำ

ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) ถุงกูดำโดยการย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซินพบว่าต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ, LO) ของกุ้งปกติที่ไม่ติดเชื้อแปลกปลอมมีลักษณะการเรียงตัวของเซลล์น้ำเหลืองที่มีลักษณะเป็น eosinophilic รอบๆ ท่อเลือดที่เรียกว่า lumen (ภาพที่ 19) ในขณะที่กุ้งในชุดควบคุมซึ่งฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์พบต่อมน้ำเหลืองบางท่อกลายเป็นก้อนกลมที่ไม่มี lumen ตรงกลาง (spheroid, LOS) แต่ยังคงพบต่อมน้ำเหลืองปกติกระจายอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 20) ส่วนกุ้งรอดตายจากการติดเชื้อ WSSV และ YHV 4-7 สัปดาห์ พบต่อมน้ำเหลืองส่วนใหญ่กลายเป็น spheroid ที่มีเซลล์จับกินกับที่ เซลล์เม็ดเลือด และเศษเซลล์ต่างๆ รวมกัน บางท่อพบเซลล์ที่ย้อมไม่ติดสีแทรกอยู่ภายใน และพบเซลล์เม็ดเลือดที่เข้ามาห้อมล้อม spheroid มากขึ้น (ภาพที่ 21-22) เมื่อกุ้งรอดตายนานขึ้น 8-10 สัปดาห์ สามารถพบต่อมน้ำเหลืองปกติได้มากขึ้น (ภาพที่ 23) ส่วนเนื้อเยื่ออื่นของกุ้งรอดตายจากการเตรียมตัวอย่างและย้อมสีดังกล่าวไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ

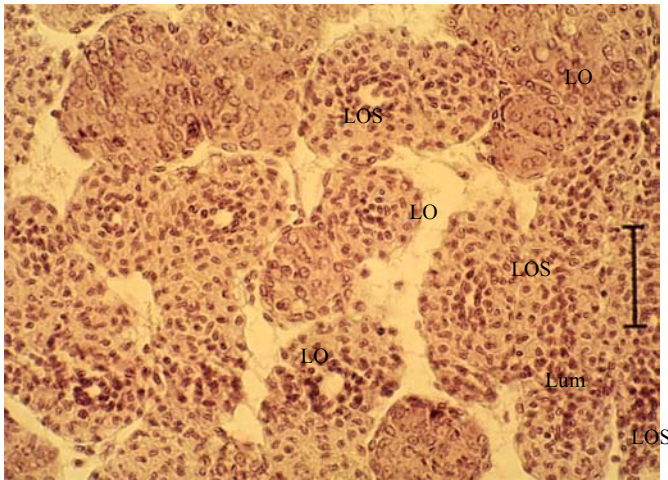
สำหรับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อถุงกูดำที่ติดเชื้อ MBV/HPV พบ spheroid และต่อมน้ำเหลืองปกติกระจายอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 24) เซลล์ตับและตับอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงต่างจากกุ้งปกติอย่างชัดเจน ท่อตับที่ติดเชื้อ MBV และมีก้อนโปรตีนของไวรัสอยู่ มีลักษณะสปีเล็ก มีเซลล์แวกคิวโอล (vacuolated cell) และ reserves cell (R-cell) จำนวนน้อย ช่องว่างภายในท่อตับกว้างขึ้น ส่วนท่อตับของกุ้งที่ติดเชื้อ HPV จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะดังกล่าวเด่นชัดกว่ากุ้งที่ติดเชื้อ MBV (ภาพที่ 25-27) ส่วนเนื้อเยื่ออื่นๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับกุ้งปกติ



50 μm

ภาพที่ 19 เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำปกติ ท่อน้ำเหลืองมี lumen ตรงกลางท่อ (LO, lymphoid organ tube; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μm)

Figure 19 The lymphatic tube with central lumen of normal *Penaeus monodon* (LO, lymphoid organ tube; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μm).

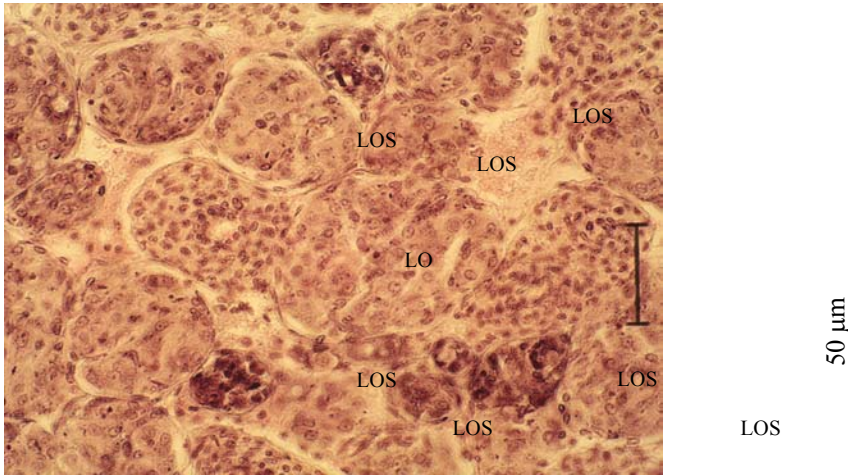


LOS

50 μm

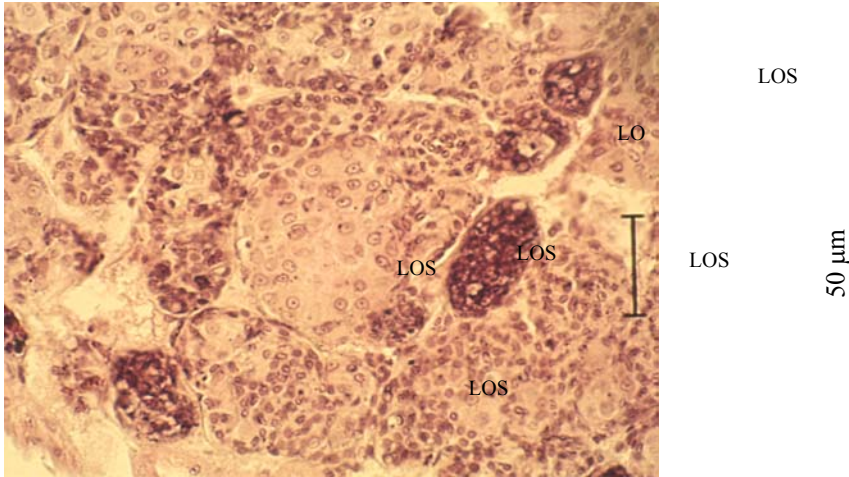
ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำผ่านการฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 32 วัน พบท่อน้ำเหลืองส่วนใหญ่ปกติ (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μm)

Figure 20 Lymphoid organ of *Penaeus monodon* with a period of 32 day of PBS injection, the figure showed numerous lymphatic tube with a central lumen. (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).



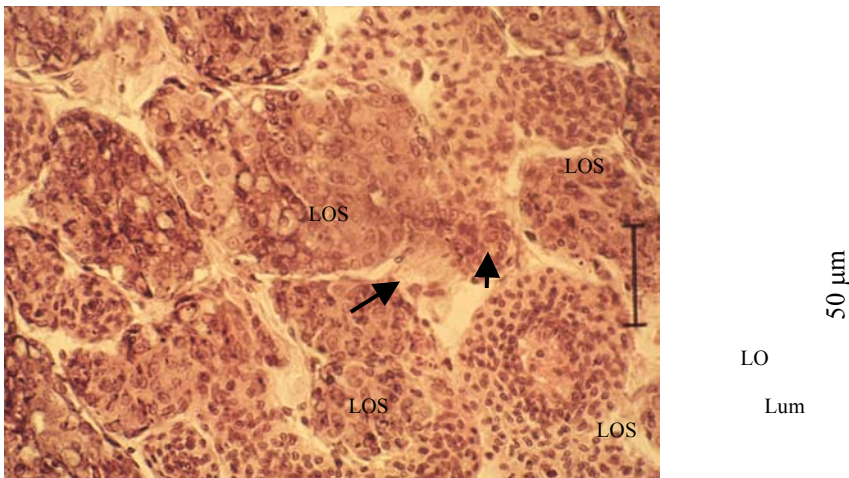
ภาพที่ 21 เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV 32 วัน พบต่อมน้ำเหลืองแบบ spheroid ขนาดต่างๆ รอบต่อมน้ำเหลืองปกติ (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).

Figure 21 Lymphoid organ of *Penaeus monodon* induced by YHV after a 32 day period, the figure showed the several spheroids around normal lymphatic tube (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).



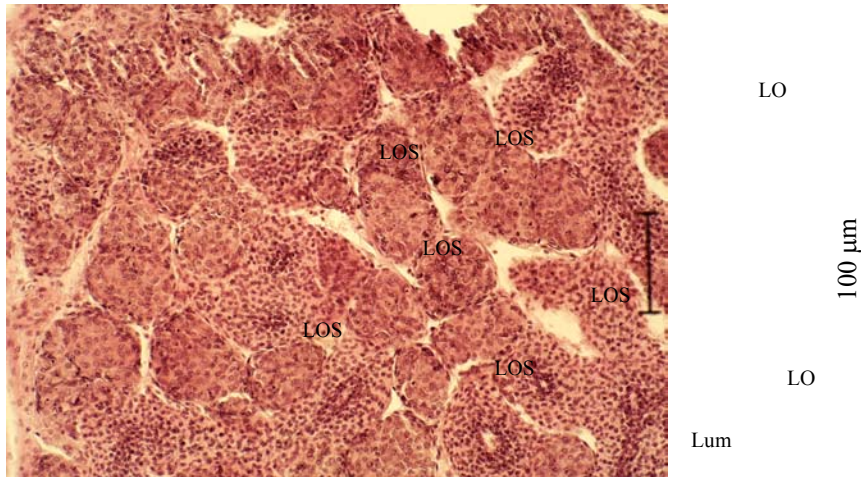
ภาพที่ 22 เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 43 วัน มีท่อน้ำเหลืองส่วนใหญ่แบบ spheroid หลายขนาดและรูปแบบ (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).

Figure 22 Lymphoid organ of shrimp induced by WSSV after a 43 day period, the lymphatic showed several sizes and formation of spheroid (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).



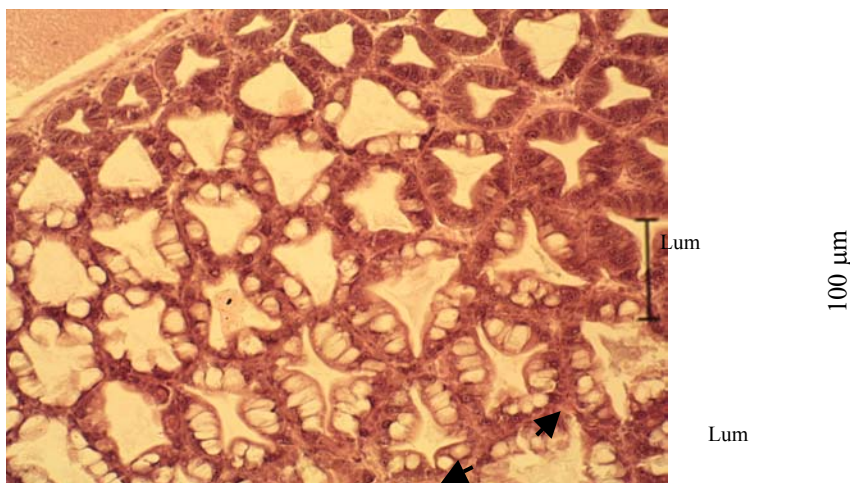
ภาพที่ 23 เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV 57 วัน พบท่อน้ำเหลืองแบบ spheroid มากกว่าที่ปกติ บางท่อนพบเซลล์ล้อมไม่ติดสี (ครีซี) บริเวณ spheroid (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m)

Figure 23 Lymphoid organ of shrimp induced by WSSV after a 57 day period, the lymphatic showed numerous spheroids with no affinity for the stain of the cells (arrow). (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid; Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 50 μ m).



ภาพที่ 24 เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำติดเชื้อ MBV/HPV ท่อน้ำเหลืองที่กลายเป็น spheroid มีรูปแบบและขนาดไม่แตกต่างกัน (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid, Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 100 μ m)

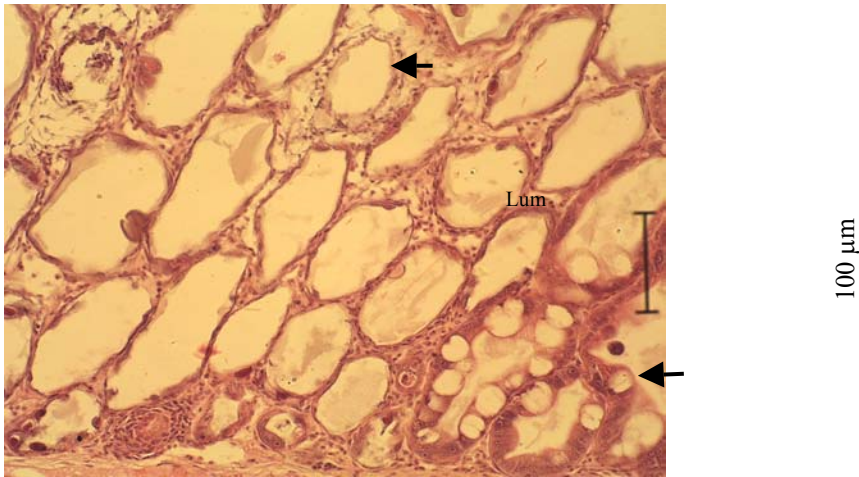
Figure 24 Lymphoid organ of MBV/HPV infected *Penaeus monodon*, the figure showed spheroid with not difference in size and formation. (LO, lymphoid organ tube; LOS, lymphoid organ spheroid, Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 100 μ m).



ภาพที่ 25 เนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำปกติพบ reserve cell (R-cell) (สรชี้) จำนวนมากช่องว่างกลาง

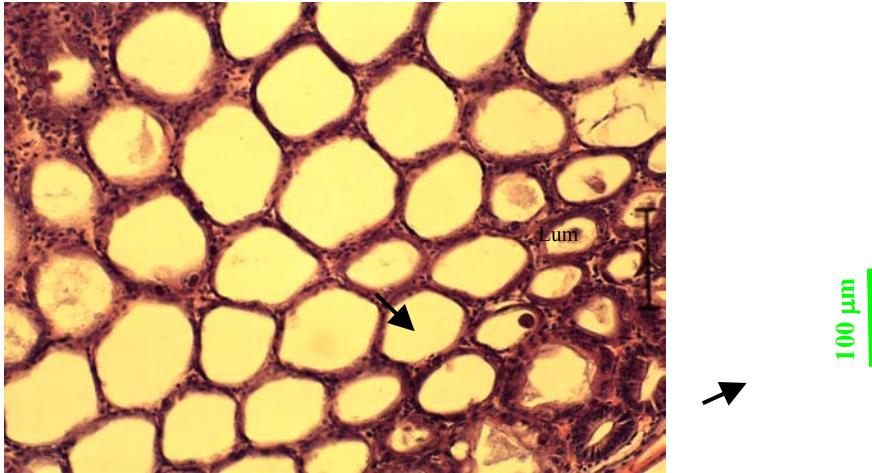
เซลล์เป็นรูปดาว (Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar =100 μ m)

Figure 25 Normal hepatopancreas of normal *Penaeus monodon*, noted were numerous reserve cells (R-cell) (arrow) with star shaped of central lumen. (Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 100 μ m).



ภาพที่ 26 เนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำติดเชื้อ MBV ที่มีก้อนโปรตีนของไวรัส (occlusion bodies) (สรชี้) พบช่องว่างภายในท่อตับกว้างขึ้น เซลล์ตับลีบ ภายในท่อตับพบเซลล์แวกคิวโอล และ R-cell จำนวนน้อย (Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 100 μ m).

Figure 26 Hepatopancreas of MBV infected *Penaeus monodon*, the figure showed occlusion bodies of virus (arrow), and dilation of intertubular spaces of hepatopancreas with atrophied, small vacuoles and R-cell. (Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 100 μ m).



ภาพที่ 27 เนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำติดเชื้อ HPV มีก้อนไวรัส (inclusion bodies) (ศรชี้) พบช่องว่างภายในท่อตับกว้างขึ้น เซลล์ตับลีบ ภายในท่อตับไม่พบเซลล์แวกคิวโอล และ R-cell (Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative bar = 100 μm).

Figure 27 Hepatopancreas of HPV infected *Penaeus monodon*, the figure showed inclusion bodies of virus (arrow), and dilation of intertubular spaces of hepatopancreas with atrophied, without vacuole and R-cell. (Lum, lumen; H&E; Davidson's fixative, bar = 100 μm).