



รายงานการวิจัยและการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ฉบับสมบูรณ์
รหัสโครงการ 15638

การพัฒนาสารยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อ EHP เพื่อนำไปใช้ผสมอาหารกุ้ง
และลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในกุ้งขาว
Development of inhibitors of spore germination-based feed additives to
control EHP infection in shrimp

คณะผู้วิจัย

ดร. กัลยาณิ ศรีธัญญลักษณ์-แดงดีบ

ดร. ศุภรัตน์ แดงชัยภูมิ

รองศาสตราจารย์ ดร.สิริพงษ์ ฐิตะมาตี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรชума อธิฐสถิตไพศาล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ทุนอุดหนุนการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ประจำปีงบประมาณ 2562

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยการพัฒนารวิจัยการเกษตร จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก) ประจำปีงบประมาณ 2562 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

บทคัดย่อ

โรคระบาด Hapatopancreatic microsporidiosis (HPM) ในกึ่งทะเลเกิดจากการติดเชื้อไมโครสปอริเดียน *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) กุ้งที่เป็นโรค HPM จะโตช้า มีขนาดไม่สม่ำเสมอ ทำให้ผลผลิตตกต่ำ ต้นทุนสูงและเกษตรกรประสบภาวะขาดทุนจากการเลี้ยง การสำรวจความชุกของการเกิด HPM ในบ่อเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2562 พบว่ามีถึง 60.1% และยังไม่มีความชัดเจนในการแก้ไขปัญหาได้ การสร้างองค์ความรู้ความเข้าใจพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ EHP และกลไกการก่อโรคนั้นมีความสำคัญ เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้ในการลดปัญหา ผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการติดเชื้อ EHP ที่จะนำไปสู่การเกิดกุ้งโตช้าจะขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อและอายุของกุ้ง โดยพบว่าถ้าเกษตรกรใช้ลูกกุ้งที่ติดเชื้อ EHP จะทำให้กุ้งโตช้าซึ่งจะเห็นการโตช้าอย่างชัดเจน เมื่อเลี้ยงกุ้งไปเป็นระยะเวลา 2 เดือน คณะผู้วิจัยจึงมีคำแนะนำให้เกษตรกรใช้ลูกกุ้งปลอดเชื้อและได้พัฒนาวิธีตรวจทาง PCR ที่เรียกว่า SWP-PCR ขึ้นเนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง สามารถนำมาใช้ในการคัดกรองลูกกุ้งได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่า ถึงแม้เกษตรกรจะใช้ลูกกุ้งปลอดเชื้อ EHP แล้วก็ตาม ยังคงมีรายงานการระบาดของเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยงอยู่ คณะผู้วิจัยจึงสร้างแนวทางการวิจัยในโครงการนี้ออกเป็น 2 รูปแบบกล่าวคือ การสร้างองค์ความรู้ในการแพร่กระจายของเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยงและกลไกการก่อโรคที่เกิดขึ้นในบ่อ ร่วมกับการตรวจหาความเป็นไปได้ที่จะมีแหล่งสะสม (Environmental reservoirs) ของเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยง ผลงานวิจัยพบว่าสปอร์ของเชื้อ EHP ที่อยู่ในซีกุ้งที่ติดเชื้อจะเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อ EHP ในน้ำในบ่อเลี้ยง หลังจากสปอร์เข้าไปในทางเดินอาหารของกุ้ง จะผ่านไปยังกระเพาะอาหารและตับ เมื่อสปอร์อยู่ในระดับที่มีค่า pH สูง สปอร์จะงอกโดยการสร้าง polar tube โดยจะมีการจับกันระหว่าง polar tube protein ที่อยู่บน Polar tube กับ receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ Host อย่างจำเพาะเจาะจง เมื่อมีการจับกันอย่างคงที่แล้ว จะมีการส่งถ่าย sporoplasm จากสปอร์เข้าไปในเซลล์ของ Host จากนั้นกระบวนการเพิ่มจำนวนของ EHP จะเกิดขึ้นในเซลล์ เมื่อเพิ่มปริมาณในเซลล์ได้จำนวนมาก เซลล์ก็จะแตกและสปอร์ก็จะส่งไปยังลำไส้และซีกุ้งต่อไป ผลงานวิจัยนี้ทำให้เกิดการทดลองที่กำลังดำเนินการอยู่เพื่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ เช่น การให้อาหารที่ทำให้ตับกุ้งมี pH และแคลเซียมต่ำลง การใช้ antibody ต่อ polar tube protein เพื่อขัดขวางกระบวนการส่งถ่ายของเชื้อเข้าสู่เซลล์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 1 นาทีสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ จึงแนะนำให้ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่มีส่วนประกอบของสัตว์น้ำเพื่อทำลายสปอร์ที่อาจปนเปื้อนมาบางส่วนประกอบของอาหาร สำหรับการศึกษาหา environmental reservoirs ในบ่อเลี้ยง พบว่าบ่อที่มีกุ้งติดเชื้อ EHP อย่างหนัก มักจะมีหอยสองฝาในกลุ่ม *Mytilopsis* sp. เช่นหอยกะพงอยู่ในบ่อ โดยเฉพาะที่เสาไม้ของสะพานยอ เป็นต้น เมื่อศึกษาในรายละเอียดก็พบว่าหอยกะพงสามารถเป็น mechanical reservoir ของสปอร์ของเชื้อ EHP ได้ และเหนี่ยวนำให้กุ้งติดเชื้อได้เช่นกัน จึงมีคำแนะนำให้ทำลายหอยชนิดนี้ขณะเตรียมบ่อและขณะดำเนินการเลี้ยง ผลงานวิจัยที่ได้ยังนำไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมหาสายพันธุ์ต้านเชื้อ EHP จากการค้นพบ microsatellite markers ที่สามารถแยกกุ้งที่มีการติดเชื้อต่างๆจากกุ้งที่มีการติดเชื้อสูงๆในบ่อเลี้ยงเดียวกันได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางที่สำคัญในการพัฒนาสายพันธุ์กุ้งต้านเชื้อ EHP ต่อไป องค์ความรู้ที่ได้จากผลงานวิจัยเหล่านี้จะสามารถต่อยอดให้เกิดแนวทางการป้องกันและควบคุมโรคระบาด HPM จากการติดเชื้อ EHP ได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นแนวทางที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป

คำสำคัญ : โรคระบาดในกุ้ง, การติดเชื้อ EHP, การงอกของสปอร์, พาหะของเชื้อ EHP, การพัฒนาสายพันธุ์กุ้งต้าน EHP

Abstract

Hepatopancreatic microsporidiosis is a shrimp disease caused by a microsporidian, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). Shrimp with HPM will be slow growth, high size variation of shrimp in the culture pond leading to low productivity, high investment cost and economic loss. High prevalence of EHP in shrimp farms in Thailand was surveyed in 2019 to be 60.1%. Until now, there is no effective strategy to control EHP. In our opinion, the scientific knowledge to better understand the characteristics and pathogenesis is important to design the effective measures for EHP in shrimp. Our previous results suggested that the negative effects of EHP infection depend on the shrimp stage and the severity of EHP infection. The post larval stage is highly susceptible. If the farmers stock the infected PLs, the negative impact on shrimp growth performance will be demonstrated at two month of culture period. We thus recommended the farmers to screen PLs carefully for the EHP infection status by using our established highly sensitive and specific SWP-PCR method before stocking. Recent reports revealed that even the farmers use the EHP-free PL, the EHP infection in the culture pond are still detected. In this project, we designed to work with two topics including to better understand the spread and pathogenesis of EHP, and screening of an environmental reservoir in the culture pond. Our results indicate that the spores of EHP excreted in the feces of the EHP infected shrimp is the spreading agent. Once the spores were in the water, it can pass through shrimp mouth, to the digestive tract of the non-infected shrimp. The polar tube extrusion is a necessary process for EHP spores to infect the shrimp cells and occurs at shrimp hepatopancreas and intestine with the optimal pH for the extrusion process. After polar tube extrusion, the polar tube protein on the polar tube will bind to specific host cell membrane receptor before transmission of its sporoplasm to the host cells. Then the replication of EHP occurs. High number of EHP spores in the cells will lead to cell disruption and releasing of EHP spores to the shrimp feces and the rearing water in the pond. To apply the information to inhibit polar tube extrusion of EHP spores, the interference of polar tube protein and host cell receptor was demonstrated by using antibody against polar tube proteins, and the application of feed to reduce pH and calcium content in shrimp hepatopancreas. In addition, the spores heated at 75 °C for at least 1 minute can inhibit spore activity. It is recommended that the shrimp feed pellet should pass through high temperature during the production process to inactivate EHP spores contaminated from the feed ingredients. To screen for environmental reservoir of EHP, we found the bivalve of the genus *Mytilopsis* could be a

mechanical carrier for EHP. Co-habitation of EHP-positive bivalve with the naïve shrimp resulted in all shrimp infected with EHP. It is recommended to ensure the removal of the bivalve from the culture pond during pond preparation and during cultivation. Along with the other results, we have observed the variation of EHP infection levels among individual shrimps in the experimental tanks of at least two lots we tested. When compared the genetic patterns by microsatellite markers amplification, we found the microsatellite markers that can distinguish the high EHP infected group from the low infected group. The markers might have a potential to use in the development the EHP-resistant family. Taken together, our results based on scientific information could be used to design the effective, environmental friendly strategies to control EHP infection in shrimp.

Keywords: Hepatopancreatic microsporidiosis (UPM), *Enterocytozoon hepatopanaei* (EHP), Polar tube extrusion, Environmental reservoirs, EHP-resistant shrimp

สารบัญเรื่อง

บทที่	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xiv
1 บทนำ	1
2 วิธีการวิจัย	5
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี	5
2.2 การสกัดสปอร์เชื้อ EHP	5
2.3 วิธีการศึกษาเพื่อตรวจหาโฮสต์กักตุนเชื้อ (reservoir) ในบ่อเลี้ยงกุ้ง	5
2.4 การทดสอบการติดเชื้อ EHP ในห้องทดลองโดยวิธีโดยวิธีเลี้ยงร่วม (co-habitation)	7
2.5 การทดสอบการติดเชื้อ EHP ในห้องทดลองโดยวิธีการฉีดสปอร์เข้าตับ (Injection)	7
2.6 การทดสอบปัจจัยกระตุ้นการงอกของสปอร์ EHP	7
2.7 การตรวจหาเชื้อ EHP โดยวิธี In-situ hybridization	8
2.8 การตรวจหาโปรตีน PTP2 จากสปอร์โดยวิธี immunofluorescence	9
2.9 การทดสอบยับยั้งยีน PTP2 โดยใช้ dsRNA เพื่อลดการติดเชื้อในกุ้งขาว	9
2.10 การวัดปริมาณเชื้อ EHP โดยวิธี PCR	10
2.11 การสร้างแอนติบอดี IgY จากไข่ไก่เพื่อใช้ยับยั้งสปอร์ EHP	10
2.12 การทดสอบยับยั้งเชื้อ EHP โดยใช้ยาฆ่าเชื้อ Albendazole	11
2.13 การทดสอบคัดแยกกุ้งสายพันธุ์ที่ต้านการติดเชื้อ EHP ได้ดีโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม	11
3 ผลการวิจัย	13
3.1 กลไกการก่อโรคของเชื้อ <i>Enterocytozoon hepatopenaei</i> ในกุ้งขาว	13
3.2 งานวิจัยเพื่อศึกษาโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ polar tube extrusion ของสปอร์เชื้อ EHP	19
3.3 แนวทางการแก้ไขปัญหการติดเชื้อ EHP ในกุ้งจากผลงานวิจัย	22
3.4 งานวิจัยเพิ่มเติม (ตามคำแนะนำของกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ)	37

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	ข้อวิจารณ์และบทสรุปผลการทดลอง	40
5	ข้อเสนอแนะ	45
6	เอกสารอ้างอิง	46

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นการงอกของสปอร์กลุ่ม Microsporidian	4
2	แสดงข้อมูลบ่อที่กักตุนเชื้อ EHP จำนวน 11 บ่อ และบ่อที่ผ่าน criteria	24

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ EHP ที่แยกได้จากกึ่งที่ติดเชื้อ (ซ้าย) ลักษณะพยาธิสภาพในเซลล์ดับกึ่งที่เกิดจากเชื้อ EHP พบปริมาณสปอร์จำนวนมาก (S) ในเซลล์ที่ติดเชื้อ (ขวา)	3
2 แสดงข้อมูลการศึกษาพยาธิสภาพจากกึ่งที่สำรวจจำนวน 196 บ่อ หมายเลขบ่อสี่เหลี่ยม แสดงถึงตัวอย่างกึ่งที่มีการติดเชื้อ EHP คิดเป็นร้อยละ 62 ของการสำรวจ	3
3 แสดงตัวอย่างวงจรชีวิตของเชื้อกลุ่ม microsporidian 2 ชนิดคือ <i>Enterocytozoon bieneusi</i> (บน) และ <i>Encephalitozoon intestinalis</i> , 1) spore extrusion, 2) sporoplasm injection, 3) sporoplasm multiplication, 4) Multiple fission, 5) initiates sporulation, 6) spore dissemination	4
4 แสดงขั้นตอนการผลิตแอนติบอดี IgY เพื่อใช้ยับยั้งเชื้อ EHP โดยเริ่มจากการสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ PTP2 สำหรับใช้เป็นแอนติเจน จากนั้นจะนำไปฉีดเข้าแม่ไก่เพื่อกระตุ้นให้ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะ หลังจากการกระตุ้นจะทำการเก็บไข่จากแม่ไก่เพื่อนำมาสกัด IgY โดยใช้ PEG8000 ก่อนจะนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ EHP ในหลอดทดลองต่อไป	11
5 แสดงแผนผังการทดลองเพื่อคัดแยกลักษณะสายพันธุ์กึ่งที่ต้านทานการติดเชื้อ EHP ได้ดี โดยอาศัยข้อมูลระดับการติดเชื้อในกึ่งหลังจากการทดสอบการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี cohabitation และการตรวจวิเคราะห์ลักษณะสายพันธุ์กึ่งโดยใช้ข้อมูล microsatellite marker	12
6 แสดงวิธีการเหนี่ยวนำให้กึ่งทดลองติดเชื้อ EHP โดยเลี้ยงร่วมกับกึ่งติดเชื้อ EHP ในถังทดลองเดียวกัน แต่เลี้ยงแยกส่วนกัน ทำให้น้ำสามารถหมุนเวียนระหว่างกึ่งทดลองและกึ่งติดเชื้อ	13
7 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ EHP ในขี้กึ่งและน้ำเลี้ยงกึ่งที่ติดเชื้อโดยการทำ wet smear จะพบสปอร์เชื้อจำนวนมากโดยเฉพาะในตัวอย่างขี้กึ่ง เมื่อย้อมด้วยสี phloxine B จะเห็นสปอร์บางส่วนที่งอก (ลูกศร) ซึ่งทำให้สันนิษฐานได้ว่า การถ่ายทอดเชื้อ EHP น่าจะเกิดจากการกระจายของ spore จากกึ่งติดเชื้อในระบบน้ำ	14
8 แสดงผลการตรวจการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP โดยวิธี SWP-PCR ในกึ่งทดลองที่นำไปเลี้ยงในถังทดลองที่มีการเลี้ยงกึ่งติดเชื้อ EHP มาก่อนหน้านี้ (A) กึ่งทดลองที่ไม่ได้เลี้ยงในถังทดลองที่ไม่เคยเลี้ยงกึ่งติดเชื้อ EHP (B) กึ่งทดลองที่เลี้ยงในถังทดลองที่มีการเลี้ยงกึ่งติดเชื้อ EHP มาก่อน	14

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9 แสดงผลของอุณหภูมิที่ 75°C ต่อการงอกของสปอร์อัตราการงอกของสปอร์ลดลงเป็นอย่างมากเมื่อสปอร์ได้รับการบ่มที่ 75°C, 45-60 วินาที	15
10 แสดงผลการตรวจ EHP โดยใช้วิธี SWP-PCR ในกึ่งกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีสปอร์ที่ผ่านความร้อน (75°C) และกึ่งกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีสปอร์ที่ไม่ผ่านความร้อน (No heat) จำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม	16
11 แสดงผลของระดับ pH กระตุ้นให้อัตราการงอกของสปอร์แตกต่างกันโดยอัตราการงอกของสปอร์เมื่อทดสอบในหลอดทดลองจะแปรผันตาม pH ที่เพิ่มขึ้นของสารละลาย ที่ pH ประมาณ 8.0 อัตราการงอกจะสูงในขณะที่ pH ต่ำ การงอกของ EHP จะลดลง	16
12 แสดงระดับ pH ที่วัดได้ในทางเดินอาหารของกิ้งขาว โดยวัดที่กระเพาะอาหาร ตับและลำไส้กึ่งที่ไม่ติดเชื้อ EHP	17
13 การตรวจติดตามสารพันธุกรรมเชื้อ EHP ด้วยวิธี in situ hybridization ในกึ่งที่ติดเชื้อ EHP จะพบตำแหน่งของเชื้อ EHP ในส่วนของเซลล์ตับเป็นหลัก (ลูกศร) ไม่พบที่กระเพาะอาหารหรือส่วนอื่นของทางเดินอาหาร (AMC; anterior midgut caecum, HP; hepatopancreas, Int; Intestine)	17
14 แสดงผลการตรวจหาสปอร์ที่มีการงอกในอวัยวะของทางเดินอาหารของกึ่งด้วยเทคนิค Immunofluorescence สปอร์ที่งอกแล้วอยู่ในวงสีขาว พบสปอร์ที่งอกแล้วในตับและลำไส้เท่านั้น	18
15 แสดงการงอกของสปอร์เชื้อ EHP ที่ถูกกระตุ้นด้วย buffer ที่มี pH 9.5 และ 20 μ M Calcium ionophore A23187 และถูกยับยั้งด้วยสาร Chelating agent (EGTA)	19
16 แสดงผลการวิเคราะห์ protein profiles ของ total spore protein (TSP) และ polar tube protein (PT) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Mass spectrometry พบจำนวนโปรตีนที่เหมือนกัน 282 โปรตีน และเป็นโปรตีนที่จำเพาะต่อสปอร์ 161 โปรตีน และจำเพาะต่อ polar tube 168 โปรตีน	20
17 ผลการวัดปริมาณยีน PTP2 ในกึ่งที่มีการติดเชื้อ EHP โดยวิธี RT-PCR ใน 2 ช่วงเวลาหลังการเลี้ยงร่วม พบว่ายีน PTP2 จะแสดงออกสูงในระยะ 22 วันหลังการติดเชื้อ และสัมพันธ์กับปริมาณการเพิ่มจำนวนของตัวเชื้อ EHP	21

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 การระบุตำแหน่งโปรตีน PTP2 โดยใช้วิธี immunofluorescence ใน spore เชื้อ EHP ที่กระตุ้นให้งอกและย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน PTP2 พบว่าโปรตีน PTP2 จะมีตำแหน่งอยู่รอบโครงสร้าง polar tube โดยส่วนใหญ่ (ภาพ immunofluorescence แสดงสัญญาณโปรตีน PTP2 เป็นสีเขียว) และจะไม่พบที่เม็ดสปอร์ ซึ่งต่างจากโปรตีน spore wall protein 1 ที่พบเฉพาะโครงสร้างของเม็ดสปอร์เป็นหลัก (ภาพ immunofluorescence แสดงสัญญาณโปรตีน SWP1 สีเขียวรอบเม็ดสปอร์) ภาพถ่าย immunofluorescence ถ่ายด้วยกล้อง confocal กำลังขยาย 600 เท่า	21
19 แสดงความสำคัญของการแสดงออกของ PTP2 ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP (A) การเพิ่มจำนวนของ EHP ในกึ่งที่ติด EHP และไม่ได้รับ dsRNA-PTP2 (B) การเพิ่มจำนวนของ EHP ในกึ่งที่ติด EHP และได้รับ dsRNA-PTP2 ปริมาณ 10 µg ต่อน้ำหนักกึ่ง 1 กรัม	22
20 แสดง Consensus sequences ของตัวอย่าง 18S rRNA ของสิ่งมีชีวิตแขวนลอยในบ่อ ER7 และ ER12 อ่านผลตรงกับ <i>Mytilopsis leocophaeata</i> ที่ accession no. KX713323.1	25
21 แสดง Consensus sequences ของตัวอย่าง 18S rRNA ของสิ่งมีชีวิตแขวนลอยในบ่อ ER21 อ่านผลตรงกับ <i>Perna viridis</i> ที่ accession no. MK419109.1	26
22 ลักษณะหอยกะพงที่พบบริเวณขอบบ่อและเสาสะพานของบ่อเลี้ยงกุ้ง	27
23 ภาพ Gel electrophoresis ของการทดลอง cohabitation ระหว่างกึ่งที่ติดเชื้อ EHP และหอยกะพงปลอดเชื้อ ณ วันที่ 0, 7 และ 20 ของการทดลอง ขนาดของแถบ nested PCR เท่ากับ 148 bp M: 2 log marker N1, N2: Negative control ของ first และ nested PCR step ตามลำดับ 1-10: ตัวอย่างหอยกะพงที่เลี้ยงร่วมกับกึ่งที่ติดเชื้อ EHP P: EHP pure fragment of positive control	27
24 ภาพ Gel electrophoresis ของการทดลอง cohabitation ระหว่างหอยที่ติดเชื้อ EHP และกึ่งปลอดเชื้อ ณ วันที่ 0 และ 10 ของการทดลอง ขนาดของแถบ nested PCR เท่ากับ 148 bp M: 2 log marker N1, N2: Negative control ของ first และ nested PCR step ตามลำดับ 1-5 และ 1-10: ตัวอย่างกึ่งที่เลี้ยงร่วมกับหอยกะพงที่ติดเชื้อ EHP วันที่ 0 และ 10 ตามลำดับ P: EHP pure fragment of positive control	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
25	29
<p>ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ digestive organ ของหอยกะพงที่ติดเชื้อ EHP ที่กำลังขยาย 10X และ 40X เนื้อเยื่อ digestive gland ไม่พบเชื้อ EHP อยู่ในเซลล์ (A1 และ B1) แต่พบ positive signal จากการทำ in situ hybridization (A2 และ B2) การตรวจยืนยัน specificity ของ SSU probe ด้วย WSSV probe ไม่พบ signal ในที่ที่พบจากการตรวจด้วย SSU probe (A3 และ B3)</p>	
26	30
<p>ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับกึ่งที่ติดเชื้อ EHP จากการย้อมสี H&E และ in situ hybridization A,B และ C: เนื้อเยื่อของกึ่งที่ตัดติดต่อกันเพื่อศึกษาด้วยการย้อม H&E, in situ hybridization ด้วย SSU probe และ WSSV probe ตามลำดับ, D และ E: ตับกึ่งที่ติดเชื้อ EHP พบลักษณะของ spore (Sp) และ plasmodium (Pl) ในเซลล์เยื่อตับจำนวนมาก สอดคล้องกับผล in situ hybridization ที่ตรวจด้วย SSU probe แสดง positive signal จำนวนมาก (B)</p>	
27	31
<p>การศึกษาเนื้อเยื่อของหอยกะพงที่ติดเชื้อ EHP ด้วยวิธี Transmission electron microscopy (TEM) ไม่พบลักษณะของเชื้อ EHP ในเซลล์ของ digestive gland แต่พบเพียง vesicle ที่บรรจุ degraded material ที่อยู่ในเซลล์เท่านั้น (ครีซี)</p>	
28	31
<p>การตรวจ digestive organ ด้วยวิธี wet mount พบสปอร์ของเชื้อ EHP ที่มีชีวิตจากการแสดงการงอก polar filament ของสปอร์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)</p>	
29	32
<p>ผลการตรวจความจำเพาะของ IgY-PTP2 ที่สร้างขึ้น โดยใช้เทคนิค Western Blot analysis พบว่าสามารถตรวจพบ PTP2 ใน TSP และ PT ได้ โดยโปรตีน EHP-PTP2 มีขนาดประมาณ 31 kDa</p>	
30	33
<p>แสดงผลการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP โดยใช้ SWP-PCR การทดลองการใช้ IgY-PTP2 ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในกึ่ง โดยแบ่งกึ่งทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ประกอบด้วยกลุ่มที่ได้รับสปอร์ของเชื้อ EHP อย่างเดียว (EHP spore) กลุ่มที่ได้รับสปอร์ของเชื้อพร้อมกับ preimmune IgY (EHP spore+ Pre-immune) และกลุ่มที่ได้รับสปอร์ร่วมกับ IgY-PTP2 (EHP spore + Anti-PTP2 IgY)</p>	
31	34
<p>แสดงผลการตรวจเชื้อ EHP ด้วยวิธี SWP-PCR ภายหลังจาก 21 วันที่ให้อาหารต่างชนิดกัน โดยกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมสปอร์ที่มีชีวิต (Positive feed) กลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมสปอร์ที่ตายแล้ว โดยการผ่านความร้อนที่ 75 °C นาน 1 นาที (Negative feed) กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาดและตรวจพบว่ามีสปอร์ของเชื้อ EHP ด้วยวิธี PCR</p>	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
32	แสดงผลการตรวจหาระดับการติดเชื้อในลูกกึ่งที่ทดสอบการติดเชื้อ EHP ด้วยวิธี cohabitation โดยตัวอย่างลูกกึ่งทั้ง 10 ตัวมาจากการทดสอบในถังเดียวกัน วิธีการตรวจหาเชื้อ EHP ใช้วิธี PCR ผลการทดสอบแสดงโดยการทำ agarose gel electrophoresis จะพบผลิตภัณฑ์ PCR 2 ขนาดคือ 514 คู่เบสและ 148 คู่เบส ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าในชุดลูกกึ่งที่ทดสอบ cohabitation ในบ่อเดียวกัน มีระดับการติดเชื้อ EHP ที่ไม่เท่ากัน ซึ่งอาจจะบ่งชี้ถึงการต้านทานการติดเชื้อได้มากน้อยต่างกัน ระหว่างลูกกึ่ง	35
33	ผลการตรวจหาเชื้อ EHP โดยวิธี in situ hybridization เพื่อจำแนกกึ่งที่ต้านการติดเชื้อ EHP ได้ดี จากการสุ่มตัวอย่างกึ่งจำนวน 12 ตัว ณ เวลาต่างกันหลังทดสอบการติดเชื้อ (กึ่งหมายเลข 1E-6E เก็บตัวอย่างวันที่ 14 และกึ่งหมายเลข 7E-12E เก็บตัวอย่างวันที่ 16 หลังทดสอบการติดเชื้อ EHP) พบว่ามีกึ่งที่ติดเชื้อในปริมาณมากประมาณ 50% (หมายเลข 1E-3E และหมายเลข 7E-9E) ขณะที่ตัวอย่างอีกส่วนไม่มีพบสารพันธุกรรมของ EHP ในตับ หรือพบได้น้อยกว่า (หมายเลข 4E-6E และหมายเลข 10E-12E) การทดสอบนี้จะใช้ nucleotide probe สังเคราะห์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 18s ของเชื้อ EHP ผลบวจากปฏิกิริยาการจับกันระหว่างสารพันธุกรรมจะแสดงเป็นจุดสีน้ำตาลดำ	36
34	ผลการตรวจการติดเชื้อ EHP ในตัวอย่างลูกกึ่งจากตัวอย่างกึ่ง 5 บ่อโดยวิธี nested PCR ผลตรวจหาเชื้อ EHP ที่ให้ผลบวกจะพบผลิตภัณฑ์ PCR 2 ขนาดคือ 514 base pairs และ 148 base pairs	38
35	แผนภูมิแสดงผลบันทึกน้ำหนักกึ่งเฉลี่ยและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกึ่งจากตัวอย่างกึ่ง 5 บ่อโดยอัตราการติดเชื้อในกึ่งที่เลี้ยงได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ติดเชื่อน้อย (1 ตัวใน 10 ตัวอย่าง, S), ติดเชื้อปานกลาง (3-4 ใน 10 ตัวอย่าง, M) และ ติดเชื้อมาก (ติดทั้งหมดใน 10 ตัวอย่าง, L)	38
36	แสดงผลการติดเชื้อ EHP เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสม Albendazole และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสม ในการทดลองทำในกึ่ง 3 บ่อ โดยแยกเลี้ยงเป็น 2 ถัง ถังที่ได้รับอาหารผสม และถังที่ได้รับอาหารปกติ ทำการเลี้ยงกึ่งเป็นเวลา 30 วัน ทำการสุ่มกึ่ง 6-8 ตัวมาตรวจหาระดับเชื้อ EHP โดยวิธี SWP-PCR	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
37 แสดงสมมติฐานการเกิดการงอกของสปอร์ของเชื้อ EHP ในดักกิ้ง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือการมี pH ที่แตกต่างกันในระดับกระตุ้นให้เกิดการไหลของน้ำและแคลเซียมเข้าสู่สปอร์ ทำให้สปอร์บวมและกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ที่มีการสร้าง polar tube ที่มี PTP2 ออกมา	42
38 แสดงขั้นตอนการถ่ายทอดสารพันธุกรรมที่อยู่ใน sporoplasm ของเชื้อไมโครสปอริเดียน ภายหลังจากการงอกของ polar tube โดยโปรตีนที่อยู่บน polar tube จะจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ของ Host ก่อนที่จะทำการถ่ายย้าย sporoplasm จากสปอร์ไปยัง host cell เพื่อเพิ่มจำนวนในเซลล์	42
39 แสดงการแพร่กระจายของสปอร์ของเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยงที่เกิดจากสปอร์ที่อยู่ในซีกกึ่งที่ติดเชื้อหรือสะสมอยู่ในหอยกะพงที่มีชีวิตในบ่อ เมื่อหอยตายก็สามารถแพร่กระจายสปอร์ของเชื้อออกสู่น้ำและกึ่งที่เลี้ยงในบ่อต่อไป	43

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

EHP	<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i>
PTP2	Polar tube protein 2
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
dsRNA	Double-stranded RNA
ml	Milliliter
μ l	Microliter
mM	Millimolar
μ M	Micromolar
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
PCR	Polymerase chain reaction
$^{\circ}$ C	Degree Celsius
H&E	Hematoxylin and Eosin dye staining

บทที่ 1 บทนำ

Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) เป็นเชื้อปรสิตในกลุ่ม Microsporidian ที่ฝังตัวในเซลล์ตับ (hepatopancreas) ของกุ้ง พบรายงานการติดเชื้อ EHP ในกุ้งทะเลเลี้ยงเป็นจำนวนมากในทุกพื้นที่เลี้ยงกุ้งของไทย ถึงแม้การติดเชื้อ EHP ในกุ้งนั้นไม่ก่อให้เกิดการตายแบบยกบ่อ แต่เป็นความเสียหายเรื้อรัง กล่าวคือเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องแบกรับภาระการเลี้ยงที่ยาวนานขึ้น พร้อมกับต้นทุนการเลี้ยงที่สูงขึ้น นอกจากนี้กุ้งที่ติดเชื้อ EHP จะมีโอกาสติดเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ ได้ง่ายขึ้นเนื่องจากความสามารถในการต้านทานการติดโรคต่ำลง การยับยั้งการแพร่ระบาดของ EHP ในกลุ่มการเลี้ยงกุ้งในทุกระดับคือทั้งระดับชาติและนานาชาติล้วนมีความจำเป็นทั้งสิ้น

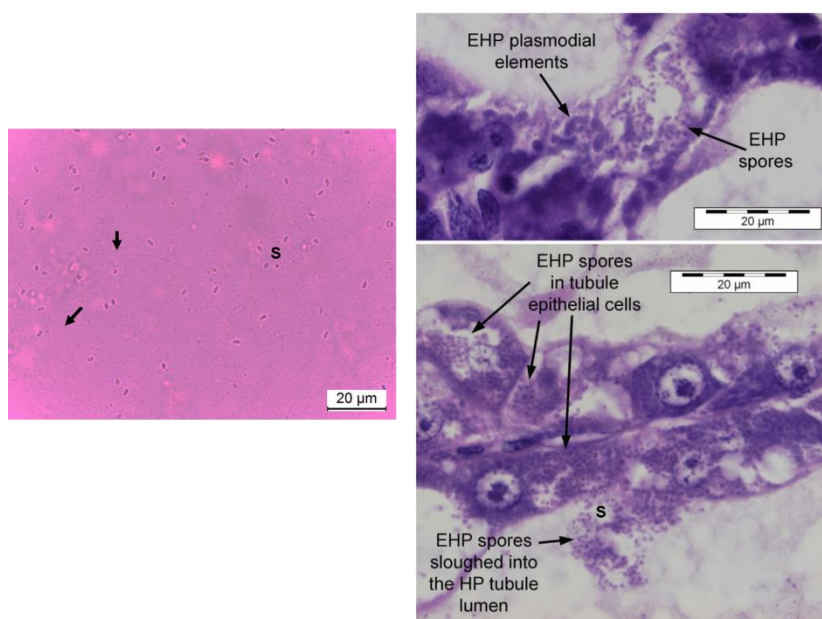
Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) เป็นเชื้อกลุ่มปรสิตที่อยู่ในเซลล์ไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ชัดเจนในกุ้ง (ภาพที่ 1, (Sanguanrut *et al.* 2018) แต่มีส่วนเกี่ยวข้องสำคัญกับอาการโตช้า และทางเดินอาหารหลุดลอกในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อพบว่าสาเหตุหลักที่ทำให้กุ้งที่ติดเชื้ออ่อนแอและไม่โตคือ การแย่งพลังงาน (ATP) จากเซลล์เป้าหมายของตัวเชื้อ EHP เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ไม่มีระบบเอนไซม์ที่ใช้สร้างพลังงานเอง (Wiredu Boakye *et al.* 2017) กลไกการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ข้อมูลเบื้องต้นพบว่า เชื้อ EHP สามารถถ่ายทอดจากกุ้งที่ติดเชื้อได้เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับกุ้งปกติ โดยจะเห็นผลการติดเชื้อด้วยวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมในระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน (Salachan *et al.* 2017) รูปแบบการแพร่กระจายเชื้อของปรสิตกลุ่มนี้ค่อนข้างจำเพาะคืออาศัยโครงสร้างที่เรียกว่าสปอร์ซึ่งพบได้ทั่วไปในเชื้อปรสิตกลุ่ม *Nosema*, *Enterocytozoon* และ *Encephalitozoon* ซึ่งติดเชื้อกระจายทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและแมลง (Xu and Weiss 2005) อย่างไรก็ตาม กรณีการถ่ายเชื้อของ EHP จากกุ้งที่ติดเชื้อไปยังกุ้งปกติสันนิษฐานว่าอาจจะไม่จำเพาะเฉพาะสปอร์ แต่อาจรวมถึงเชื้อในระยะ plasmodium ด้วยก็ได้ กลไกการแพร่เชื้อหลักในปรสิตกลุ่มนี้ จะอธิบายลักษณะการถ่ายเชื้อผ่านทางสปอร์ เมื่อสัตว์กินสปอร์จะเกิดกระบวนการกระตุ้นที่จำเพาะ ซึ่งทำให้สปอร์งอกและเกิดการส่งผ่าน sporoplasm ไปที่เซลล์เป้าหมายเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อและสร้างสปอร์ขึ้นมาใหม่ก่อนจะแพร่กระจายต่อไป จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ในหลาย species พบว่ามีกลไกหลายแบบที่กระตุ้นให้สปอร์ของเชื้อปรสิตเกิดการงอกได้ อย่างไรก็ตาม ไมโครสปอริเดียนที่จำเพาะกับสัตว์แต่ละกลุ่มก็มีกลไกการติดเชื้อผ่านทางสปอร์ที่ไม่เหมือนกัน โดยเฉพาะในสัตว์น้ำซึ่งยังไม่ทราบวิธีที่แน่ชัด

การศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่ามีปัจจัยหลายอย่างส่งผลต่อการกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้ เช่น สารเคมี ไอออนของแร่ธาตุบางชนิด โพรตีนกลุ่มเอนไซม์ และโพรตีนที่พบบนผิวเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย รวมถึงสภาวะภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ ความดันบรรยากาศ และค่าความเป็นกรด-ด่างของสภาวะแวดล้อม โดยกลไกหลักที่เกิดจากสารเคมี โพรตีน หรือสภาวะแวดล้อมต่างๆ คือ การกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนของแรงดันภายในสปอร์ของเชื้อทำให้เกิดการเร่งการงอกของ polar tube ในขั้นตอนต่อมา (Xu and Weiss 2005, Williams 2009, Undeen 1990) นอกจากนี้ การงอกของสปอร์ยังควบคุมโดยโพรตีนที่พบใน

โครงสร้างของสปอร์ ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วนหลักๆคือ polar tube protein (PTP) และ spore wall protein (SWP) โดยโปรตีนที่พบทั้ง 2 ชนิดสามารถแบ่งแยกได้อีกหลาย isoform และพบในตำแหน่งต่างๆกันภายในโครงสร้างของสปอร์ ยกตัวอย่างเช่น PTP4 พบมากที่บริเวณปลายของท่อ polar tube ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะทำหน้าที่เกาะกับโปรตีนบนผิวเซลล์เป้าหมายเพื่อยึดโครงสร้าง polar tube ไว้กับเซลล์ก่อนที่จะมีการถ่าย sporoplasm (Han *et al.* 2017) ส่วน SWP9 จะพบมากบริเวณส่วน Anchoring disk (AD) ซึ่งเป็นตำแหน่งของการงอกของ polar tube โดยโปรตีนชนิดนี้จะเกาะอยู่กับ PTP1 ที่อยู่บนท่อ polar tube สันนิษฐานว่าการทำงานของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดเกี่ยวข้องกับการม้วนตัวของโครงสร้าง polar tube ในขั้นตอนการสร้างสปอร์ และควบคุมการติดตัวของ polar tube ในขณะที่เกิดการงอกของสปอร์ (Yang *et al.* 2017) เป็นต้น

ในกรณีของเชื้อ EHP ที่พบในกุ้ง ยังไม่มีรายงานการศึกษากลไกการถ่ายเชื้อผ่านสปอร์เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ลักษณะเฉพาะของการติดเชื้อ EHP ในกุ้งคือจะพบเชื้อได้เฉพาะในเซลล์ตับเท่านั้นซึ่งทำให้สันนิษฐานว่า กลไกการก่อโรคน่าจะแตกต่างจากเชื้อ microsporidian กลุ่มอื่น และเป็นไปได้ว่ากลไกการติดเชื้ออาจจะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโมเลกุลบางชนิด (เช่น โปรตีน) ที่พบเฉพาะในเนื้อเยื่อตับเท่านั้น จากการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับพันธุกรรมของเชื้อ EHP พบว่ามียีนที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการก่อโรค โดยเฉพาะในกระบวนการงอกและถ่ายเชื้อเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย เช่น Polar tube protein gene และ spore wall protein gene ทำให้สันนิษฐานได้ว่ากลไกก่อโรคของ EHP บางอย่างเช่น host-binding protein หรือ spore wall-polar tube protein interaction รวมถึงวงจรชีวิตขณะติดเชื้อ อาจจะคล้ายกับ microsporidian ชนิดอื่น (ภาพที่ 3) โดยเฉพาะกลุ่มที่ติดเชื้อในแมลง

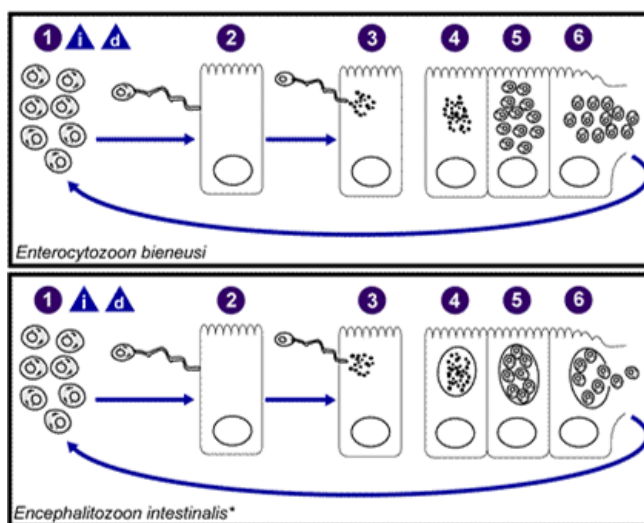
เนื่องจากในปัจจุบันการแพร่กระจายของเชื้อ EHP ค่อนข้างรุนแรง (ภาพที่ 2) และส่งผลกระทบต่อสายการผลิตในอุตสาหกรรมกุ้งอย่างมาก โดยผลกระทบหลักคือเพิ่มต้นทุนในการเลี้ยง ผลผลิตต่อไร่ลดลง เนื่องจากกุ้งโตช้า เสี่ยงต่อการเกิดโรคอุบัติซ้ำเนื่องจากกุ้งอ่อนแอ ทำให้ปัญหาการติดเชื้อ EHP ในระบบเลี้ยงกุ้งจำเป็นต้องแก้ไขเร่งด่วน การศึกษากลไกการก่อโรคของเชื้อนี้จึงมีความจำเป็น การศึกษากลไกการติดเชื้อโดยมุ่งที่กลไกการเข้าสู่เซลล์ในระยะแรกๆของเชื้อผ่านทางสปอร์ จะทำให้ทราบรูปแบบการติดเชื้อที่เฉพาะของ EHP และจะนำไปสู่การยับยั้งตั้งแต่ต้นด้วยวิธีที่เฉพาะ อาจจะทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ EHP ในกุ้งได้



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ EHP ที่แยกได้จากกุ้งที่ติดเชื้อ (ซ้าย) ลักษณะพยาธิสภาพในเซลล์ตับกุ้งที่เกิดจากเชื้อ EHP พบปริมาณสปอร์จำนวนมาก (S) ในเซลล์ที่ติดเชื้อ (ขวา) (คัดลอกภาพจาก (Sanguanrut et al. 2018))

AHPND by histology and/or PCR	No AHPND but bacterial lesions	Collapsed HP tubule epithelia	Normal HP histology
03, 06, 07, 11, 12, 16, 17, 19, 20, 32, 40, 47, 50, 52, 54, 74, 84, 91, 93, 110, 112, 116, 119, 122, 126, 131, 136, 144, 150, 160, 161, 162, 166, 167, 168, 169, 172, 181, 191, 199, 200	04, 05, 21, 24, 44, 45, 51, 58, 69, 75, 79, 86, 87, 88, 96, 99, 101, 117, 130, 133, 139, 143, 170, 174, 186, 192, 196, 197, 198	02, 15, 25, 26, 29, 30, 37, 38, 46, 48, 49, 53, 64, 65, 76, 80, 81, 82, 83, 90, 95, 97, 104, 109, 113, 114, 115, 123, 125, 127, 128, 134, 135, 158, 159, 163, 165, 171, 173, 175, 178, 179, 182, 184, 185, 187, 188, 189, 193	01, 08, 09, 10, 13, 14, 18, 22, 23, 27, 28, 31, 33, 34, 35, 36, 39, 41, 42, 43, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73, 77, 85, 89, 92, 94, 98, 100, 102, 103, 105, 106, 107, 108, 111, 118, 120, 121, 124, 129, 132, 137, 138, 140, 141, 142, 145, 148, 149, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 164, 176, 177, 180, 183, 190, 194, 195
41/196 (20.9%)	29/196 (14.8%)	49/196 (25.0%)	77/196 (39.3%)

ภาพที่ 2 แสดงข้อมูลการศึกษาพยาธิสภาพจากกุ้งที่สำรวจจำนวน 196 บ่อ หมายเลขบ่อสีเหลืองแสดงถึงตัวอย่างกุ้งที่มีการติดเชื้อ EHP คิดเป็นร้อยละ 62 ของการสำรวจ (คัดลอกจาก (Sanguanrut et al. 2018))



ภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างวงจรชีวิตของเชื้อกลุ่ม microsporidian 2 ชนิดคือ *Enterocytozoon bienersi* (บน) และ *Encephalitozoon intestinalis*, 1) spore extrusion, 2) sporoplasm injection, 3) sporoplasm multiplication, 4) Multiple fission, 5) initiates sporulation, 6) spore dissemination (คัดลอกจาก <https://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis/>)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นการงอกของสปอร์กลุ่ม Microsporidian

Biological factors		
Species	Effective factor	Action
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Calmodulin-dependent kinase	Activation of Calcium camodulin activating casecade leads to spore swelling
<i>Anncaliia algerae</i>	Trehalase	Digest trehalose to glucose leading to hyperosmotic pressure
<i>Spraguea lophii</i>	Catalase	Break-down fatty acid and converted H_2O_2 to O_2 leads to swelling
Chemical factors		
<i>Nosema algerae</i>	Monovalent ions (F^- , Cl^- , Br^- , I^-)	Activates spore shooting
<i>Glugea hertwigi</i>	Calcium ionophore	Initiates polaroblast swelling

บทที่ 2 วิธีการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำหรับการทดลองประกอบด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ชุดเตรียมตัวอย่างสำหรับเนื้อเยื่อวิทยา สารเคมีที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย สารละลาย percoll (GE Healthcare), ชุดเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Invitrogen), ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ (Qiagen), ชุดน้ำยาสกัดอาร์เอ็นเอ (Invitrogen), แอนติบอดี (Cell Signaling), ชุดน้ำยาสกัดโปรตีน (GE Healthcare, Bio-Rad), ชุดน้ำยาแยกขนาดของโปรตีน (Bio-Rad, GE Healthcare), ชุดน้ำยาล้างปริมาณโปรตีน (Bio-Rad)

ตัวอย่างกึ่งทดลองใช้กึ่งขาวอายุเฉลี่ย 30 วัน สำหรับตัวอย่างกึ่งปลอดเชื้อ EHP ได้จากฟาร์มกึ่ง มูลนิธิชัยพัฒนา และบริษัทเครื่องเจริญโภคภัณฑ์ สำหรับกึ่งติดเชื้อ EHP ได้จากฟาร์มเขตจังหวัดปทุมธานี จันทบุรี และฉะเชิงเทรา

2.2 การสกัดสปอร์เชื้อ EHP

ใช้กึ่งที่ติดเชื้อ EHP โดยฆ่ากึ่งและแยกเอาเฉพาะตับ ประมาณ 10-20 ตัวต่อการสกัด 1 ครั้ง ตับกึ่งที่แยกได้จะบดให้แตกในหลอด 15 ml จากนั้นผสมกับน้ำกลั่นประมาณ 15 ml จากนั้นกรองเนื้อเยื่อผ่านแผ่นกรองขนาด 100 และ 40 μm ตามลำดับ น้ำที่ได้จากการกรองจะนำไปปั่นที่ความเร็ว 5000 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนน้ำทิ้ง เอาเฉพาะตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นประมาณ 2 ml เพื่อเตรียมหยอดลงในหลอดที่มีสารละลาย percoll โดยวิธีเตรียมสารละลาย percoll จะละลาย percoll 100% เป็น 75%, 50% และ 25% ตามลำดับ จากนั้นหยอด percoll 2 ml ลงในหลอด 12.5 ml โดยหยอดความเข้มข้นละ 2 ml เรียงจากมากไปน้อย หลังจากเตรียมสารละลาย percoll ในหลอดแล้วหยอดตัวอย่างที่เตรียมจากตับประมาณ 2 ml และนำไปปั่นที่ความเร็ว 5000 rpm โดยใช้ rotor แบบ swing out ควบคุมอุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สปอร์ของเชื้อ EHP จะตกที่ก้นหลอด ดูดสปอร์เชื้อใส่หลอด 1.5 ml และปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ ก่อนนำไปใช้

2.3 วิธีการศึกษาเพื่อตรวจหาโฮสต์กักตุนเชื้อ (reservoir) ในบ่อเลี้ยงกึ่ง

2.3.1 การเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในบ่อเลี้ยงกึ่งที่ติดเชื้อ EHP

ดำเนินการเก็บสิ่งมีชีวิตที่แขวนลอยอยู่ในน้ำบ่อเลี้ยงกึ่งจำนวน 21 บ่อ จากจรีฟาร์ม ในอำเภอนายายอาม และอำเภอลำลูกกา จังหวัดจันทบุรี โดยทำการตักน้ำที่ความลึกจากผิวน้ำอย่างน้อย 30 เซนติเมตร เป็นจำนวน 20 ลิตร เทผ่าน plankton net ขนาดตา 20 ไมครอน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่ติดอยู่ใน plankton net ลงในน้ำยา lysis buffer สำหรับนำไปสกัด DNA เพื่อตรวจระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตและการติดเชื้อ EHP นอกจากนี้ทำการยืนยันการติดเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยงโดยการเก็บตัวอย่างกึ่งจำนวน 10 ตัว ทำการผ่าตัดแยกนำเฉพาะส่วนตับออกและใส่ลงในน้ำยา lysis buffer สำหรับนำไปสกัด DNA เพื่อตรวจการติดเชื้อ EHP

2.3.2 การตรวจเชื้อ EHP ในตัวอย่างกุ้งและสิ่งมีชีวิตที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ

ตัวอย่างตั๊กกุ้งและสิ่งมีชีวิตที่แขวนลอยอยู่ในน้ำที่ตองอยู่ในน้ำยา Lysis buffer จะถูกนำมาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) และทำการตรวจคุณภาพและปริมาณ DNA ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง Spectrophotometer หลังจากนั้นตรวจเชื้อ EHP โดยใช้เทคนิค SWP-PCR (Jaroenlak et al., 2015) หากตัวอย่างมีปริมาณเชื้อ EHP มาก จะปรากฏแถบ DNA ในขั้นตอน first step PCR ที่ 514 bp แต่ถ้าตัวอย่างติดเชื้อในระดับต่ำ จะพบการปรากฏของแถบ DNA ในขั้นตอน nested PCR ที่ 148 bp จากการอ่านผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

2.3.3 การคัดกรองบ่อเลี้ยงที่มีสิ่งมีชีวิตที่อาจเป็นพาหะของเชื้อ EHP

ทางคณะผู้วิจัยได้สร้าง criteria สำหรับคัดเลือกพาหะของเชื้อ EHP จากบ่อเลี้ยงที่ได้รับผลกระทบจากการติดเชื้อ EHP อย่างหนัก โดยกำหนดให้บ่อที่จะทำการศึกษาพาหะของเชื้อ EHP ต้องพบการติดเชื้อ EHP ในกุ้งอย่างหนัก (Severe infection) โดยการปรากฏของแถบ DNA ในขั้น first step PCR ที่ขนาด 514 bp และกุ้งภายในบ่อนั้นต้องมีอัตราการเจริญเติบโต (Average daily growth: ADG) ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 0.1 กรัมต่อวัน ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตแขวนลอยที่ติดเชื้อ EHP ในบ่อที่ผ่าน criteria จะถูกนำไปศึกษาชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สามารถเป็นพาหะของเชื้อ EHP ต่อไป

2.3.4 การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตที่อาจเป็นพาหะของเชื้อ EHP

นำ DNA ของตัวอย่างสิ่งมีชีวิตแขวนลอยที่ติดเชื้อ EHP ในแต่ละบ่อที่ผ่าน criteria มาทำการแยกเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ 18s-rRNA gene universal primers (Pie et al., 2006) แล้วโคลน DNA template ที่ได้เข้ากับ PGEM T-easy vectors แล้วส่งไปทำ Sequencing จำนวนตัวอย่างละ 3 clones กับทางบริษัท MACROGEN, South Korea ผล DNA sequences ที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ Species ด้วยโปรแกรม BlastN, NCBI

2.3.5 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ EHP ด้วยวิธี cohabitation

จากผลการวิเคราะห์ species ในหัวข้อที่ 4 พบว่าตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่พบคือ หอยสองฝา (*Mytilopsis* sp.) หรือชื่อที่ทางเกษตรกรเรียกกันว่า หอยกะพง ดังนั้นในขั้นตอนการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ EHP ระหว่างหอยสองฝาและกุ้ง จึงดำเนินการด้วยวิธี Cohabitation โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1) การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ EHP ด้วยวิธี cohabitation ระหว่างกุ้งติดเชื้อ EHP และหอยกะพงที่ไม่ติดเชื้อ EHP

ทำการเลี้ยงกุ้งติดเชื้อ EHP จำนวน 10 ตัว ร่วมกับหอยกะพงจำนวน 150 ตัว เป็นระยะเวลา 20 วัน ก่อนการเก็บตัวอย่างทุกจะทำการล้างเปลือกหอยด้านนอก 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการผ่าเปิดเปลือกหอย แล้วนำตัวหอยออกมาล้างน้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อป้องกันการ contaminate บริเวณภายนอกเนื้อเยื่อจากน้ำเลี้ยง โดยจะทำการสุ่มตรวจการติดเชื้อในหอยครั้งแรกในวันที่ 7 ด้วยเทคนิค SWP-PCR (Jaroenlak et al., 2015) จำนวน 10 ตัว หลังจากนั้นในวันที่ 20 ของการเลี้ยงร่วม ทำการเก็บตัวอย่างหอยสำหรับตรวจการติดเชื้อด้วยเทคนิค PCR จำนวน 10 ตัว ตรวจลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค H&E staining และ

in situ hybridization จำนวน 10 ตัว ตรวจการมีชีวิตของสปอร์ด้วยวิธี Wet mount จำนวน 5 ตัว ด้วยการย้อมสี Phloxine B ตามวิธีของ Aldama-Cano et al., 2018 และตรวจระยะของ EHP ในเซลล์ด้วยเทคนิค Transmission electron microscope (TEM) จำนวน 5 ตัว

2) การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ EHP ด้วยวิธี *cohabitation* ระหว่างหอยกะพงติดเชื้อ EHP และกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ EHP

ทำการเลี้ยงหอยกะพงที่ติดเชื้อ EHP จากการทดลองที่ 1 จำนวน 60 ตัว มาเลี้ยงร่วมกับกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ EHP จำนวน 10 ตัว ในถังขนาด 100 ลิตร บรรจุน้ำ 70 ลิตร เป็นระยะเวลา 10 วัน สุ่มกุ้งจำนวน 8 ตัว โดยกุ้ง 1 ตัว จะถูกแบ่งดับเป็น 2 ส่วน ตามแนวยาว เพื่อทำการตรวจการติดเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค PCR และลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ การทดสอบนี้ เพื่อบ่งบอกว่าหอยกะพงมีความสามารถในการเป็นพาหะ และสามารถถ่ายทอดเชื้อ EHP สู่กุ้งได้หรือไม่

2.4 การทดสอบการติดเชื้อ EHP ในห้องทดลองโดยวิธีโดยวิธีเลี้ยงร่วม (co-habitation)

การเหนี่ยวนำให้กุ้งขาวติดเชื้อ EHP ภายในห้องปฏิบัติการสามารถทำได้โดยวิธีการเลี้ยงกุ้งที่ติดเชื้อแล้วร่วมกับกุ้งชุดใหม่ที่ยังไม่ติดเชื้อ โดยการทดสอบนี้จะขังกุ้งที่ติดเชื้อไว้ในกระชังหรือตะกร้าขนาดเล็กและนำไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งที่ยังไม่ติดเชื่อนานประมาณ 7 ถึง 22 วัน อัตราความหนาแน่นของกุ้งติดเชื้อต่อกุ้งไม่ติดเชื้ออยู่ที่ 1:1 ถึง 1:10 การตรวจการติดเชื้อในกุ้งที่เลี้ยงร่วมจะใช้วิธี PCR หรือตรวจโดยการย้อมเนื้อเยื่อตับ

2.5 การทดสอบการติดเชื้อ EHP ในห้องทดลองโดยวิธีการฉีดสปอร์เข้าตับ (Injection)

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบสมมติฐานการถ่ายทอดเชื้อ EHP โดยอาศัยตัวกลางคือ สปอร์ของเชื้อที่มาจากกุ้งที่ติดเชื้อแล้ว จะเข้าสู่ตับและเกิดการงอกใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อภายในเซลล์ตับ โดยวิธีทดสอบระดับห้องปฏิบัติการจะเริ่มจากการสกัดสปอร์จากกุ้งโดยวิธีการปั่นผ่านสารละลาย percoll จากนั้นคำนวณปริมาณของสปอร์ที่ได้และนำไปฉีดเข้ากุ้งที่ไม่ติดเชื้อ โดยกำหนดจำนวนสปอร์ประมาณ 1000 – 10000 สปอร์ต่อตัว ผสมในสารละลาย PBS และฉีดเข้าส่วนหัวของกุ้งให้เข้าสู่เนื้อเยื่อตับโดยตรง จากนั้นทำการเลี้ยงกุ้งต่อประมาณ 7-14 วัน ก่อนจะทำการเก็บตัวอย่างตับเพื่อตรวจหาการติดเชื้อโดยวิธี PCR

2.6 การทดสอบปัจจัยกระตุ้นการงอกของสปอร์ EHP

2.6.1 การทดสอบการงอกของสปอร์ในสารละลายที่มี pH ต่างกัน

เป็นการทดสอบปัจจัยกระตุ้นการงอกในหลอดทดลองโดยใช้สารละลายที่มี pH ระหว่าง 4.0-9.0 วิธีการทดสอบเริ่มจากการสกัดสปอร์จากกุ้งติดเชื้อ จากนั้นนำไปผสมกับน้ำกลั่นที่ปรับ pH แล้วตั้งแต่ 4.0-9.0 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นทดสอบการงอกของสปอร์โดยใช้สารละลาย 2% phloxine B และนับจำนวนสปอร์ที่งอกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

2.6.2 การทดสอบการงอกสปอร์ในสารละลาย germination buffer ที่มี calcium ionophore

เป็นการทดสอบสมมติฐานปัจจัยกระตุ้นการงอกของสปอร์ในหลอดทดลองอาจมาจากโมเลกุลของแร่ธาตุกลุ่ม cation โดยรูปแบบการกระตุ้นการงอกของสปอร์ด้วยโมเลกุลของแร่ธาตุบางชนิดสามารถพบได้ในเชื้อไมโครสปอริเดียนหลายชนิด เช่น *Spraguea* sp., *Nosema* sp. เป็นต้น จากผลการศึกษาเบื้องต้น นำไปสู่ข้อสันนิษฐานว่า กลไกการงอกของสปอร์เชื้อ EHP อาจอาศัยโมเลกุลของแร่ธาตุ ซึ่งคล้ายกับเชื้อไมโครสปอริเดียนตัวอื่นที่พบในสัตว์น้ำ วิธีการทดสอบสมมติฐานจะทำการทดลองกระตุ้นการงอกของสปอร์ EHP ในหลอดทดลอง โดยขั้นตอนแรกจะเตรียมสารละลายที่กระตุ้นการงอก (germination buffer) ซึ่งประกอบด้วย 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ และ 20 μM calcium ionophore A23187 โดยสารละลายนี้ปรับ pH ให้ได้ 9.5 การทดสอบการงอกของสปอร์จะใช้สปอร์ที่สกัดจำนวน 10⁶ สปอร์ ผสมกับ germination buffer และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 30 นาทีจากนั้นทำการย้อมสปอร์ด้วยสี 1.2% Bengal rose ในสารละลาย 50% ethanol นาน 20 นาทีและย้อมทับด้วย Hematoxylin และ Eosin ซ้ำอีกรอบ จำนวนสปอร์ที่งอกจะตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

2.6.3 การทดสอบการงอกของสปอร์โดยใช้โปรตีนสกัดจากเนื้อเยื่อทางเดินอาหารกุ้ง

อ้างอิงผลการทดสอบการติดเชื้อ EHP ในกุ้งจะพบตำแหน่งการติดเชื้อที่จำเพาะในระบบทางเดินอาหาร และโดยเฉพาะในตับ จากการทดสอบนี้นำไปสู่ข้อสันนิษฐานว่า กลไกการการติดเชื้อ EHP โดยอาศัยสปอร์ อาจจะถูกกระตุ้นด้วยสาร หรือโปรตีนบางชนิดที่อยู่ในทางเดินอาหารของกุ้ง การทดสอบสมมติฐานนี้จะทำการสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อ 3 ตำแหน่งคือ กระเพาะอาหาร ตับ และลำไส้ ซึ่งคาดว่าจะเป็ตำแหน่งอวัยวะที่เป็นทางผ่านของสปอร์ โดยวิธีการสกัดจะใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 80% ในการตกตะกอนโปรตีน ซึ่งวิธีนี้จะรักษาคุณสมบัติของโปรตีนให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้ ไม่เสียสภาพในขณะที่ตกตะกอน หลังจากทำการปั่นเอาตะกอนโปรตีนจะล้างด้วยสารละลาย PBS เพื่อกำจัดเกลือออก จากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนที่ได้ก่อนจะนำไปทดสอบการกระตุ้นการงอกกับสปอร์เชื้อ EHP ที่สกัดแล้วต่อไป วิธีการทดสอบการงอกจะผสมโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละส่วนของเนื้อเยื่อกุ้งที่ความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลาย PBS pH 7.0-8.0 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำการย้อมสปอร์ด้วยสี hematoxylin และ eosin และนับจำนวนสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.7 การตรวจหาเชื้อ EHP โดยวิธี In-situ hybridization

ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อ EHP โดยวิธี In situ hybridization เป็นการตรวจยืนยันผลร่วมกับการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี PCR โดยวิธีการนี้อาศัยข้อมูลลำดับสารพันธุกรรมของเชื้อ และทำการตรวจหาสารพันธุกรรมดังกล่าวได้โดยตรงจากเนื้อเยื่อกุ้งที่สันนิษฐานว่าจะมีการติดเชื้อ EHP ข้อดีคือสามารถระบุตำแหน่งของการติดเชื้อภายในเนื้อเยื่อกุ้งได้อย่างจำเพาะและชัดเจน โดยวิธีการตรวจเริ่มจากการสังเคราะห์ probe ที่จำเพาะกับลำดับยีนของเชื้อ การทดสอบนี้ใช้ 2 ตำแหน่งคือ 18s RNA gene และ spore

wall protein gene (SWP1) วิธีสังเคราะห์ probe เริ่มจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR และใช้น้ำยาที่มี DIG ในปฏิกิริยา โดย probe ที่ได้จะนำไปใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ EHP ที่อยู่ในเนื้อเยื่อต่อไป ในขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับย้อม เริ่มจากการดองตัดบั้งด้วยน้ำยา Davidson นาน 1 วัน ก่อนนำไปทำ semi-thin section เนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดจะนำมาแยกเอา paraffin ออกด้วยสารเคมีและบ่มกับ probe ที่เตรียมไว้ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส การทดสอบหาตำแหน่งที่มีการจับกันระหว่าง probe และสารพันธุกรรมของเชื้อจะเติมน้ำยา NBT/BCIP เพื่อเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสี สามารถอ่านผลได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

2.8 การตรวจหาโปรตีน PTP2 จากสปอร์โดยวิธี immunofluorescence

จากข้อมูลการวิเคราะห์ยีนและโปรตีนจากเชื้อ EHP พบการแสดงออกของยีนและโปรตีนชื่อ polar tube protein 2 (PTP2) ซึ่งสันนิษฐานว่าจะเป็ยงค้ประกอบหลักของโครงสร้างเชื้อ EHP และอาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรค การศึกษาโมเลกุลโปรตีนชนิดนี้จากเชื้อ EHP อาศัยการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน PTP2 ในหลอดทดลองและสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนดังกล่าวเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหา PTP2 จากเชื้อ โดยวิธีการตรวจหาโปรตีน PTP2 เพื่อระบุตำแหน่งของโปรตีน ใช้วิธีการจับกันระหว่าง PTP2 และแอนติบอดีที่จำเพาะ หลังจากนั้นทำการย้อมทับด้วยแอนติบอดีชนิดที่ 2 ที่ติดสี fluorescence สามารถระบุตำแหน่งได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพิเศษ การเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจหาโปรตีน PTP2 จะทำการสกัดสปอร์จากบั้งที่ติดเชื้อ จากนั้นนำสปอร์ที่ได้ผสมกับสารละลาย 2% phloxine B ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เพื่อกระตุ้นการงอกในหลอดทดลอง จากนั้นทำ smear โดยหยดส่วนผสมบนสไลด์และไถให้ทั่วสไลด์ นำสไลด์ที่ได้ไปตากให้แห้งก่อนนำไปย้อมด้วยแอนติบอดี (anti-PTP2) เจือจางในอัตราส่วน 1:500 โดยบ่มสไลด์ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นย้อมทับด้วยแอนติบอดีชนิดที่ 2 ซึ่งติดด้วยสี fluorescence Alexa-488 หรือ Alexa-555 บ่มสไลด์ต่อประมาณ 1 ชั่วโมง ทำการล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกและย้อมทับด้วยสีอีก 2 ชนิดคือ DAPI และ Calcofluor white M2R เพื่อระบุตำแหน่งของนิวเคลียสและเปลือกของสปอร์ตามลำดับ การถ่ายภาพ fluorescence จะใช้กล้องจุลทรรศน์ confocal

2.9 การทดสอบยับยั้งยีน PTP2 โดยใช้ dsRNA เพื่อลดการติดเชื้อในกุ้งขาว

อาศัยข้อมูลผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่มาจากเชื้อ EHP ภายหลังจากการติดเชื้อในกุ้งขาวในระยะเวลาต่างๆ พบกลุ่มยีนจากเชื้อที่มีการแสดงออกสูงในระยะแรกๆของการติดเชื้อ สันนิษฐานว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับกลไกการติดเชื้อหรือการเพิ่มปริมาณเชื้อในตัวกุ้ง เพื่อระบุบทบาทและหน้าที่ที่จำเพาะของยีนบางชนิดที่มาจากเชื้อ การทดสอบจะอาศัยวิธีการควบคุมยีนโดยการยับยั้งการแสดงออกด้วยโมเลกุล dsRNA ซึ่งสังเคราะห์ในหลอดทดลอง การทดสอบบทบาทของยีนเป้าหมายคือ PTP2 จะออกแบบการทดลองดังนี้คือ ฉีด dsRNA จำนวน 10 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม โดยฉีดเข้ากุ้งที่ติดเชื้อ EHP แล้ว จำนวน 3 ครั้ง ระยะเวลาห่างกัน 7 วันต่อครั้ง โดยกุ้งติดเชื้อ EHP ที่ได้รับ dsRNA จะนำไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งที่ยังไม่ติดเชื้อ จากนั้นจะ

ติดตามผลการทดลองโดยการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ 2 กลุ่มคือ กลุ่มตัวอย่างแรกเป็นตัวอย่างกล้ามเนื้อที่มาจากบ่อที่เลี้ยงร่วมกับกุ้งติด EHP ที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ส่วนกลุ่มตัวอย่างที่ 2 จะเป็นตัวอย่างกล้ามเนื้อที่มาจากบ่อที่เลี้ยงร่วมกับกุ้งติด EHP โดยกุ้งที่ติดเชื้อจะได้รับ dsRNA จำนวน 3 ครั้งโดยวิธีฉีด ตัวอย่างเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้จะทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วยวิธี PCR

2.10 การวัดปริมาณเชื้อ EHP โดยวิธี PCR

ขั้นตอนนี้เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณเชื้อแบบหยาบโดยอาศัยวิธีทางอณูชีววิทยา วิธีการตรวจหาเชื้อ EHP แบบจำเพาะจะใช้ไพรเมอร์ที่จับกับสารพันธุกรรมของเชื้อในตำแหน่งที่จำเพาะกับยีน Spore wall protein (SWP1) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 2 ชุด และกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม 2 ขั้นตอนประกอบด้วย initial denaturation 94 °C 5 min, denaturation 94 °C 30 sec, annealing 58 °C, 30 sec, extension 72 °C 30 sec, final extension 72 °C 5 min โดยในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขั้นตอนแรกจะทำทั้งหมด 35 รอบ และขั้นตอนที่ 2 จะเปลี่ยน annealing เป็น 62 °C และลดจำนวนรอบเหลือ 30 รอบ เมื่อผ่านกระบวนการนี้จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 2 ขนาดคือ 514 คู่เบสและ 148 คู่เบส วิธีการวัดปริมาณเชื้อ EHP โดยวิธี nested PCR อ้างอิงตามการรายงานของ Jaroenlak P. และคณะ (Jaroenlak P., et al 2018.)

2.11 การสร้างแอนติบอดี IgY จากไข่ไก่เพื่อใช้ยับยั้งสปอร์ EHP

การทดสอบนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์การยับยั้งเชื้อ EHP สู่ระดับฟาร์มเพาะเลี้ยง โดยแนวคิดการทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อในกุ้งจะใช้โมเลกุลแอนติบอดีที่ผลิตจากไข่ไก่ที่สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก โดยวิธีการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเริ่มจากการสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ polar tube protein 2 (PTP2) ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบของโครงสร้าง polar tube จากสปอร์ของเชื้อ EHP และมีบทบาทที่สำคัญในการก่อโรค ในการฉีดกระตุ้นในไข่ไก่จะใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ 0.3-0.5 มิลลิกรัมผสมกับ complete adjuvant สัดส่วน 1:2 และฉีดเข้ากล้ามเนื้อส่วนนอกของแม่ไก่อายุ 17-18 สัปดาห์ จากนั้นจะฉีดซ้ำอีก 2 รอบห่างกันทุก 7 วันเพื่อกระตุ้นภูมิในแม่ไก่ การเก็บตัวอย่างไข่ไก่จะเก็บไข่ก่อนฉีดโปรตีน PTP2 และหลังฉีดโปรตีนครบ 3 ครั้งแล้วประมาณวันที่ 21-30 เพื่อนำมาสกัด IgY โดยวิธีการสกัดจะใช้ polyethylene glycol (PEG8000) ที่ความเข้มข้น 3%, 6% และ 12.5% ตามลำดับ โปรตีน IgY ที่สกัดได้จะล้างด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 และวัดความเข้มข้นโดยวิธี Bradford ผังขั้นตอนการผลิต IgY แสดงในภาพที่ 4

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ EHP โดยใช้ IgY เบื้องต้นจะทดสอบในหลอดทดลองโดยทำการผสมสปอร์ EHP ปริมาณ 10000 สปอร์กับโปรตีน IgY ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 30 นาทีก่อนนำสปอร์ไปฉีดเข้าปากกุ้ง (oral gavage) กุ้งที่ฉีดสปอร์เข้าปากจะนำไปเลี้ยงนาน 14 วันก่อนจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ EHP โดยเปรียบเทียบ

ระหว่างกึ่งที่ฉีดสปอร์ที่ไม่ผสมแอนติบอดีกับกึ่งที่ฉีดสปอร์ที่บ่มกับแอนติบอดี IgY ที่สามารถจับกับโปรตีน PTP2 ได้ โดยวิธีการตรวจปริมาณเชื้อใช้วิธี PCR



ภาพที่ 4 แสดงขั้นตอนการผลิตแอนติบอดี IgY เพื่อใช้ยับยั้งเชื้อ EHP โดยเริ่มจากการสังเคราะห์โปรตีนรีคอมบิแนนท์ PTP2 สำหรับใช้เป็นแอนติเจน จากนั้นจะนำไปฉีดเข้าแม่ไก่เพื่อกระตุ้นให้ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะ หลังจากการกระตุ้นจะทำการเก็บไข่จากแม่ไก่เพื่อนำมาสกัด IgY โดยใช้ PEG8000 ก่อนจะนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ EHP ในหลอดทดลองต่อไป

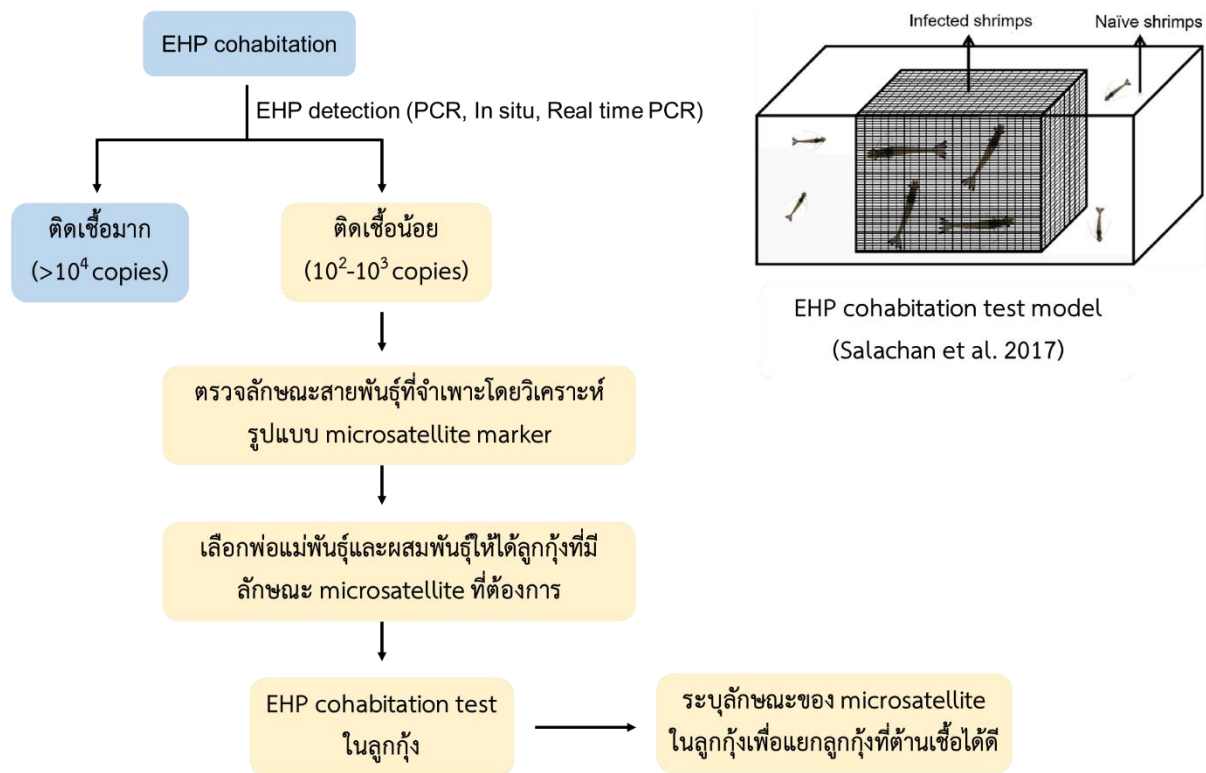
2.12 การทดสอบยับยั้งเชื้อ EHP โดยใช้ยาฆ่าเชื้อ Albendazole

การทดสอบนี้อาศัยข้อมูลการรักษาโรคติดเชื้อปรสิตกลุ่มไมโครสปอริเดียนในสัตว์บก เช่น สุนัข แมว โค และกระบือ พบว่ายาต้านปรสิตกลุ่ม Albendazole และ Metronidazole ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิธีการรบกวนการทำงานของโปรตีนกลุ่ม microtubule (Albendazole) หรือระงับการขนส่งพลังงาน ATP เข้าสู่เซลล์ของเชื้อ (Metronidazole) ทำให้เชื้อหยุดการแบ่งตัวและตายในที่สุด ทำให้สันนิษฐานว่า ยาต้านเชื้อชุดนี้อาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ EHP ที่พบในกึ่งได้ โดยวิธีการทดสอบอ้างอิงตามการรักษาการติดเชื้อในสัตว์บก โดยระบุน้ำหนักของยาที่ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสัตว์ 60 กิโลกรัม และเภสัชจลนศาสตร์ของยากลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นในระบบทางเดินอาหาร วิธีการทดสอบในกึ่งจะใช้วิธีบดยา Albendazole และเคลือบในอาหารกึ่งก่อนจะนำไปให้กึ่งที่ติดเชื้อแล้วกิน โดยให้ 1 ครั้งต่อวัน ติดต่อกันนาน 14-30 วัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างกึ่งที่ได้รับยาเพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและทำการตรวจหาปริมาณเชื้อ EHP โดยวิธี PCR เพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของการติดเชื้อระหว่างกึ่งติดเชื้อ EHP ที่ไม่ได้รับยาและกึ่งที่ได้รับยา Albendazole ที่ระยะเวลาต่างๆ

2.13 การทดสอบคัดแยกกึ่งสายพันธุ์ที่ต้านการติดเชื้อ EHP ได้ดีโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม

การทดสอบนี้อ้างอิงข้อมูลการทดสอบการติดเชื้อ EHP โดยวิธี cohabitation ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ลูกกึ่งจากหลายแหล่ง หลังจากการตรวจหาปริมาณเชื้อในลูกกึ่งที่เลี้ยงร่วมกับกึ่งติดเชื้อด้วยวิธีต่างๆ เช่น

PCR, In situ hybridization และ Real-time PCR พบข้อมูลที่น่าสนใจคือ ลูกกุ้งที่เลี้ยงบ่อเดียวกันมีระดับการติดเชื้อที่ต่างกันค่อนข้างชัดเจน (มากกว่า 10000 เท่า) จากผลการทดสอบนี้นำไปสู่ข้อสันนิษฐานว่า กุ้งแต่ละสายพันธุ์อาจมีความสามารถในการต้านการติดเชื้อ EHP ได้แตกต่างกัน การศึกษาเพื่อจะแยกสายพันธุ์กุ้งที่ต้านเชื้อ EHP ได้ดีอาจจะเป็นแนวทางสำหรับการคัดแยกกุ้งต้านเชื้อ EHP เพื่อนำไปเลี้ยงได้ในอนาคต การทดสอบนี้ ในเบื้องต้น เริ่มทดสอบโดยคัดแยกกลุ่มกุ้งที่ต้านการติดเชื้อ EHP ได้ดี (ติดเชื้อน้อย) โดยอ้างอิงผลจากการทดสอบ cohabitation จากนั้นทำการระบุลักษณะทางสายพันธุ์กุ้ง โดยอาศัยข้อมูล microsatellite หมายเลข 132 (Denise K., et al 2007) จากนั้นทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กุ้งและทดสอบผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกกุ้งที่มีลักษณะสายพันธุ์ต้านเชื้อได้ดีก่อนจะนำลูกกุ้งไปทดสอบการติดเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อระบุลักษณะทางสายพันธุ์ที่ต้านเชื้อ EHP แผนการทดลองดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงแผนผังการทดลองเพื่อคัดแยกลักษณะสายพันธุ์กุ้งที่ต้านทานการติดเชื้อ EHP ได้ดี โดยอาศัยข้อมูลระดับการติดเชื้อในกุ้งหลังจากการทดสอบการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี cohabitation และการตรวจวิเคราะห์ลักษณะสายพันธุ์กุ้งโดยใช้ข้อมูล microsatellite marker

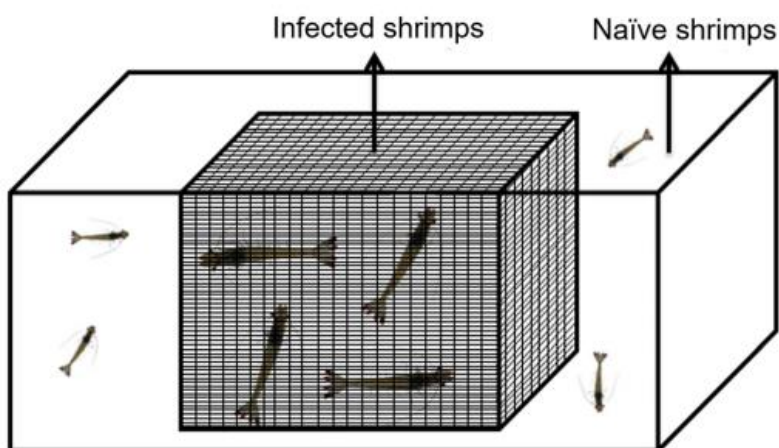
3. ผลการวิจัย

3.1 กลไกการก่อโรคของเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* ในกุ้งขาว

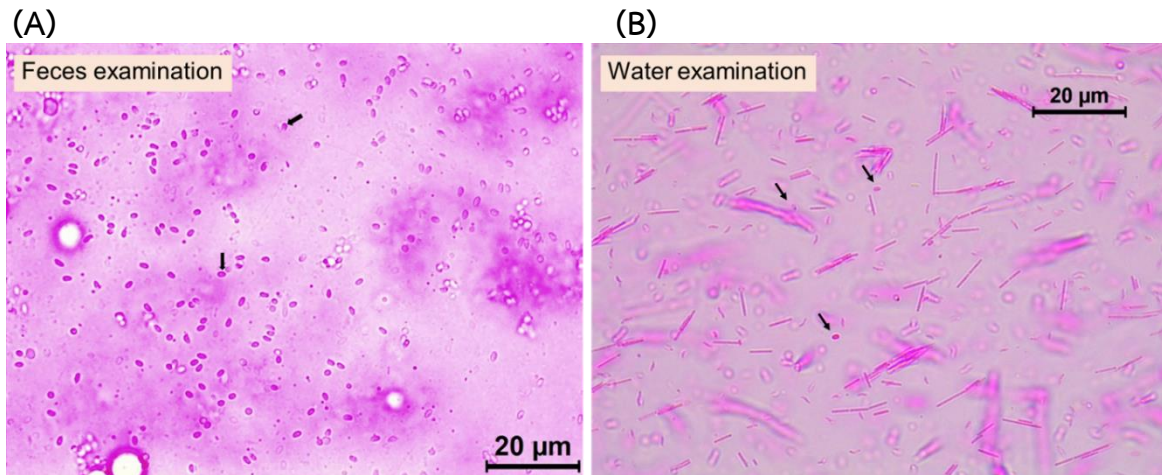
3.1.1 การพบสปอร์ของเชื้อ EHP ในซีกุ้งและน้ำเลี้ยงกุ้งติดเชื้อ EHP

ผลงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้พบว่าการเหนี่ยวนำให้กุ้งทดลองติดเชื้อ EHP ทำได้โดยการเลี้ยงกุ้งทดลองร่วมกับกุ้งติดเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยงเดียวกัน ที่เรียกว่า Co-habitation assay (Salachan et al., 2017) ดังแสดงในภาพที่ 6 ผลงานวิจัยดังกล่าวทำให้เกิดสมมติฐานว่าในซีกุ้งที่ติดเชื้อ EHP น่าจะมีสปอร์ของเชื้ออยู่ และ เมื่อกุ้งถ่ายออกมาทำให้มีการกระจายของสปอร์ออกไปในน้ำในบ่อเลี้ยง การทดลองนำกุ้งที่ติดเชื้อ EHP มาเลี้ยงในถังทดลองเป็นระยะเวลาหนึ่ง ก่อนนำซีกุ้งและน้ำเลี้ยงกุ้งมาตรวจ ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อเก็บตัวอย่างซีในลำไส้ของกุ้งที่ติดเชื้อ EHP มาตรวจสอบด้วยวิธี wet smear พบสปอร์อยู่ในซีกุ้งติดเชื้อจำนวนมาก ดังแสดงในภาพที่ 7A เมื่อนำกุ้งติดเชื้อออกจากถังทดลองและนำตะกอนก้นถังมาตรวจ พบสปอร์ของเชื้อ EHP จำนวนมาก ดังแสดงในภาพที่ 7B สปอร์ของ EHP ที่พบทั้งในซีกุ้งติดเชื้อและในน้ำที่เลี้ยงกุ้งติดเชื้อพบว่าเป็นสปอร์ที่มีชีวิต เมื่อนำมากระตุ้นให้งอกโดยใช้สารละลาย Phloxine B ก็สามารถงอกได้ การทดสอบเพิ่มเติมถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำการติดเชื้อ EHP ของน้ำในถังทดลอง โดยนำกุ้งทดลองที่ไม่ติดเชื้อมาเลี้ยงในถังทดลองพบว่ากุ้งทดลองที่ไม่ติดเชื้อ จะติดเชื้อ EHP ทั้งหมดภายใน 7 วันโดยการตรวจด้วยวิธี SWP-PCR ดังแสดงในภาพที่ 8

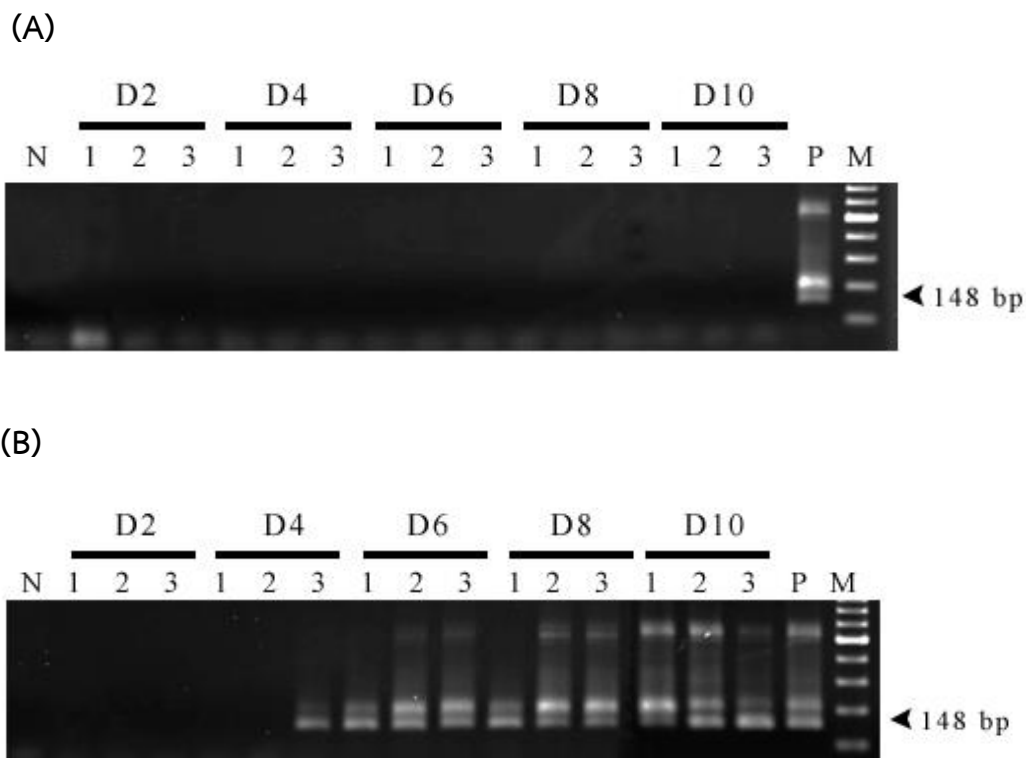
ผลงานวิจัยดังกล่าวบ่งชี้ว่าการแพร่กระจายของเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยงกุ้ง เกิดจากการแพร่กระจายของสปอร์ที่ถ่ายออกมาจากกุ้งที่ติดเชื้อเริ่มต้นในบ่อเลี้ยงไปยังกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ จนในที่สุดกุ้งเกิดการติดเชื้อทั้งบ่อ งานวิจัยในลำดับต่อไปจะทำการศึกษาคุณสมบัติของสปอร์และการกระตุ้นการงอกของสปอร์



ภาพที่ 6 แสดงวิธีการเหนี่ยวนำให้กุ้งทดลองติดเชื้อ EHP โดยเลี้ยงร่วมกับกุ้งติดเชื้อ EHP ในถังทดลองเดียวกัน แต่เลี้ยงแยกส่วนกัน ทำให้น้ำสามารถหมุนเวียนระหว่างกุ้งทดลองและกุ้งติดเชื้อ (Salachan et al., 2017)



ภาพที่ 7 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ EHP ในขี้กิ้งและน้ำเลี้ยงกิ้งที่ติดเชื้อโดยการทำให้ wet smear จะพบสปอร์เชื้อจำนวนมากโดยเฉพาะในตัวอย่างขี้กิ้ง เมื่อย้อมด้วยสี phloxine B จะเห็นสปอร์บางส่วนที่ออก (ลูกศร) ซึ่งทำให้สันนิษฐานได้ว่า การถ่ายทอดเชื้อ EHP น่าจะเกิดจากการกระจายของ spore จากกิ้งติดเชื้อในระบบน้ำ

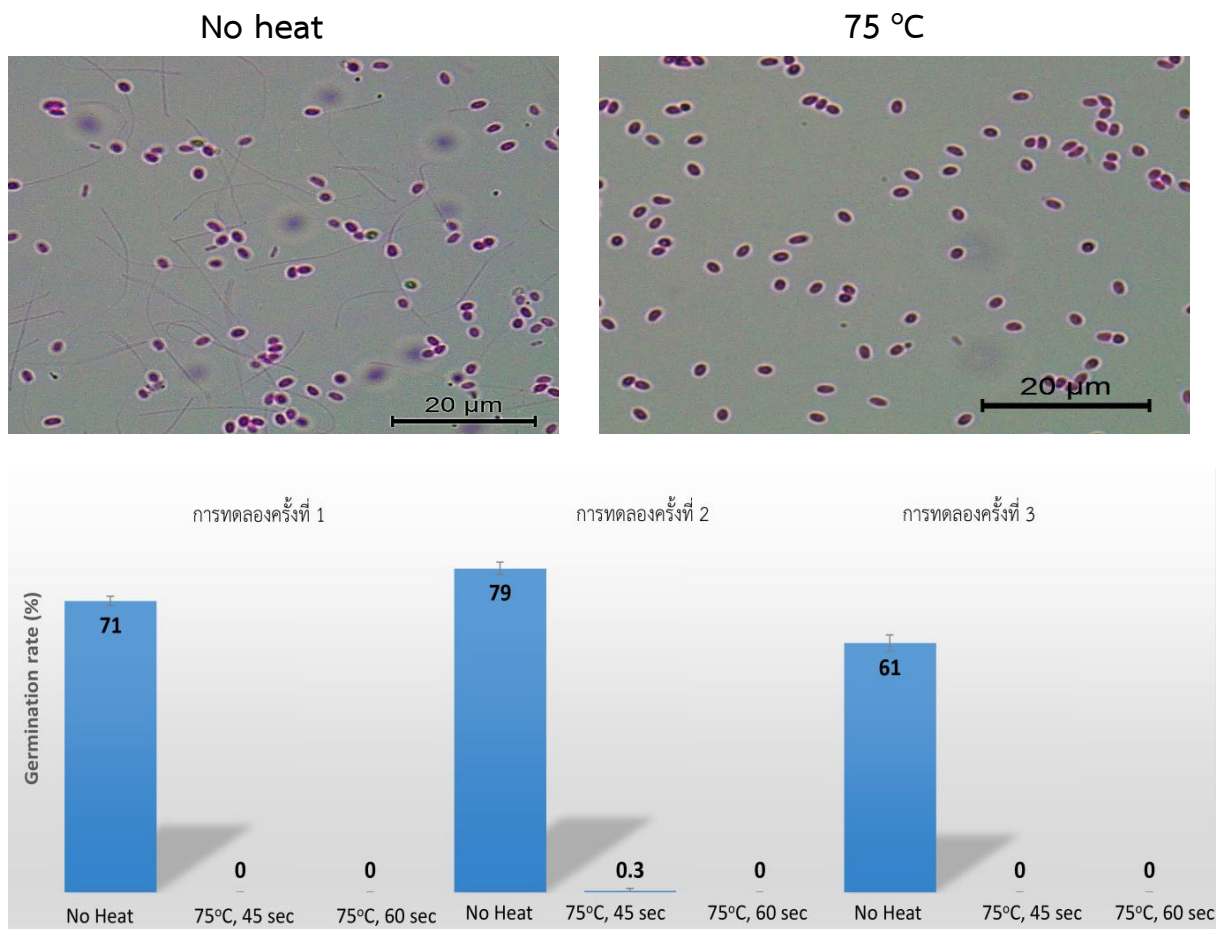


ภาพที่ 8 แสดงผลการตรวจการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP โดยวิธี SWP-PCR ในกิ้งทดลองที่นำไปเลี้ยงในถังทดลองที่มีการเลี้ยงกิ้งติดเชื้อ EHP มาก่อนหน้านี้ (A) กิ้งทดลองที่ไม่ได้เลี้ยงในถังทดลองที่ไม่เคยเลี้ยงกิ้งติดเชื้อ EHP (B) กิ้งทดลองที่เลี้ยงในถังทดลองที่มีการเลี้ยงกิ้งติดเชื้อ EHP มาก่อน

3.1.2 กลไกการก่อโรคของเชื้อ EHP

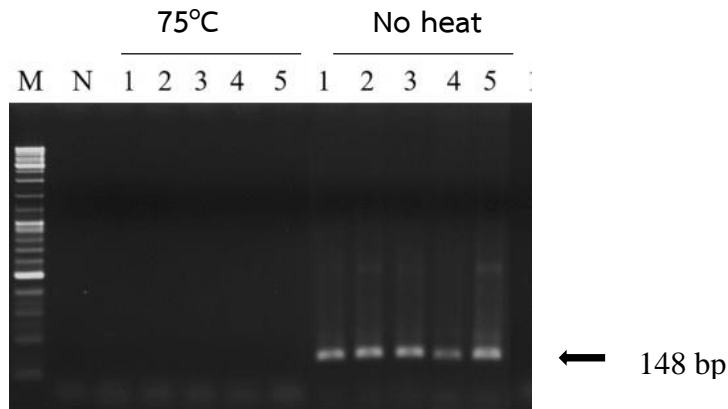
1) การงอกของสปอร์มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในกุ้ง

การทดลองเปรียบเทียบกุ้งที่ได้รับอาหารที่มีสปอร์ที่มีความสามารถในการงอกกับสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกด้วยความร้อนที่ 75°C เป็นเวลา 45 และ 60 วินาที ภาพที่ 9 แสดงจำนวนสปอร์ที่สามารถงอกได้เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 75 °C จะเห็นได้ว่าการงอกของสปอร์สามารถยับยั้งได้ด้วยอุณหภูมิสูง



ภาพที่ 9 แสดงผลของอุณหภูมิที่ 75°C ต่อการงอกของสปอร์ อัตราการงอกของสปอร์ลดลงเป็นอย่างมากเมื่อสปอร์ได้รับการบ่มที่ 75°C, 45-60 วินาที

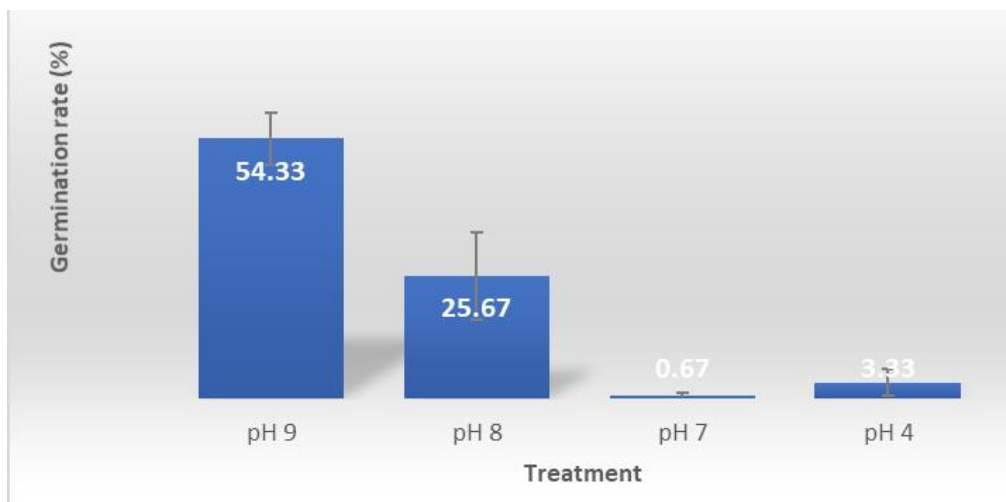
การทดลองต่อมาเพื่อศึกษาว่าการงอกของสปอร์ (polar tube extrusion) มีความสำคัญต่อการก่อโรคของเชื้อ EHP จึงได้ทำการทดลองให้อาหารที่มีสปอร์ที่สามารถงอก (No heat) และสปอร์ที่ถูกยับยั้งการงอกด้วยอุณหภูมิ 75°C ในกุ้ง (75°C) โดยให้อาหารกุ้งเป็นเวลา 14 วัน ผลการศึกษาพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมสปอร์ที่ไม่ผ่านความร้อน สามารถเพิ่มจำนวนในกุ้งได้ ขณะที่กุ้งที่ได้รับอาหารที่มีสปอร์ที่ถูกความร้อนที่ 75°C ตรวจไม่พบเชื้อ EHP ดังแสดงในภาพที่ 10 ผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าการงอกของสปอร์หรือที่เรียกว่า polar tube extrusion มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนและก่อโรคในกุ้งของเชื้อ EHP



ภาพที่ 10 แสดงผลการตรวจ EHP โดยใช้วิธี SWP-PCR ในกึ่งกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีสปอร์ที่ผ่านความร้อน (75°C) และกึ่งกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีสปอร์ที่ไม่ผ่านความร้อน (No heat) จำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม

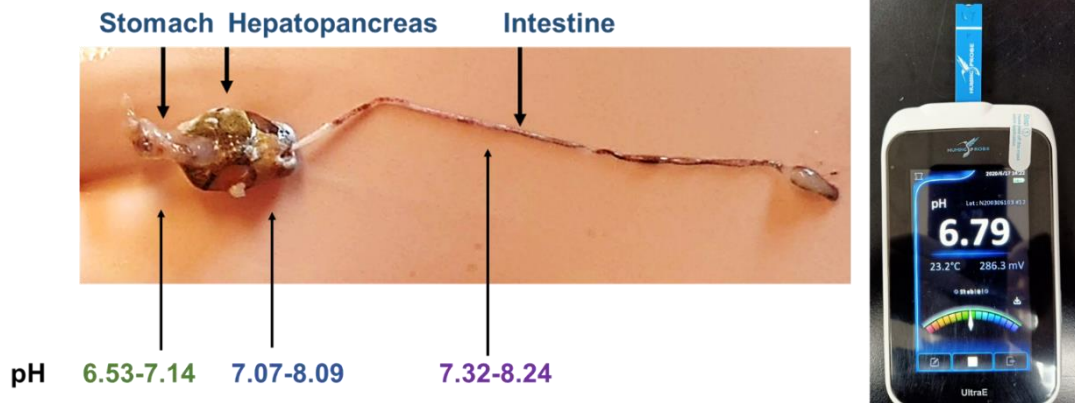
2) การกระตุ้นการงอกของสปอร์ในกึ่ง

จากการศึกษาการกระตุ้นให้สปอร์งอกในเชื้อไมโครสปอริเดียน 2 ชนิด คือ *Spraguea* sp. และ *Glugea* sp. พบว่าแคลเซียมไอออนมีบทบาทกระตุ้นให้สปอร์งอกได้ โดยอาศัยสภาวะที่เป็นด่างสูง (pH 9.5) กระตุ้นให้แคลเซียมไหลเข้าสู่สปอร์และทำให้ระดับแคลเซียมในสปอร์เพิ่มสูงขึ้น กระตุ้นการงอกของสปอร์ (Pleshinger and Weidner, 1985; Campbell et al., 2013) สำหรับงานวิจัยปัจจุบันที่กระตุ้นการงอกของสปอร์ยังไม่ทราบแน่ชัด เมื่อทดสอบด้วย pH พบว่าจำนวนสปอร์ของเชื้อ EHP งามากขึ้นในสภาวะที่มี pH ที่แตกต่างกัน แต่จะลดลงในสภาวะที่เป็นกรด (ภาพที่ 11)



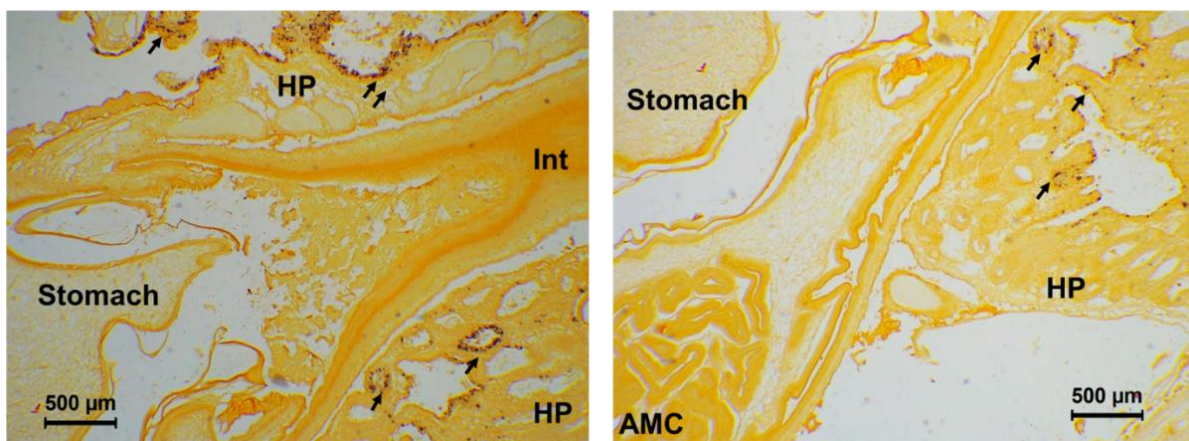
ภาพที่ 11 แสดงผลของระดับ pH กระตุ้นให้อัตราการงอกของสปอร์แตกต่างกันโดยอัตราการงอกของสปอร์เมื่อทดสอบในหลอดทดลองจะแปรผันตาม pH ที่เพิ่มขึ้นของสารละลาย ที่ pH ประมาณ 8.0 อัตราการงอกจะสูงในขณะที่ pH ต่ำ การงอกของ EHP จะลดลง

เมื่อตรวจสอบ pH ในระบบทางเดินอาหารของกิ้งก่าพบว่าค่า pH ที่วัดได้ในกระเพาะอาหารมีค่าอยู่ระหว่าง 6.53-7.14 ในขณะที่ pH ในตับและลำไส้กิ้งก่ามีค่าสูงกว่า อยู่ระหว่าง 7.07-8.09 และ 7.32-8.24 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 12 ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่าสปอร์ของเชื้อ EHP น่าจะงอกที่ตับและลำไส้ได้ดีกว่าที่กระเพาะอาหาร



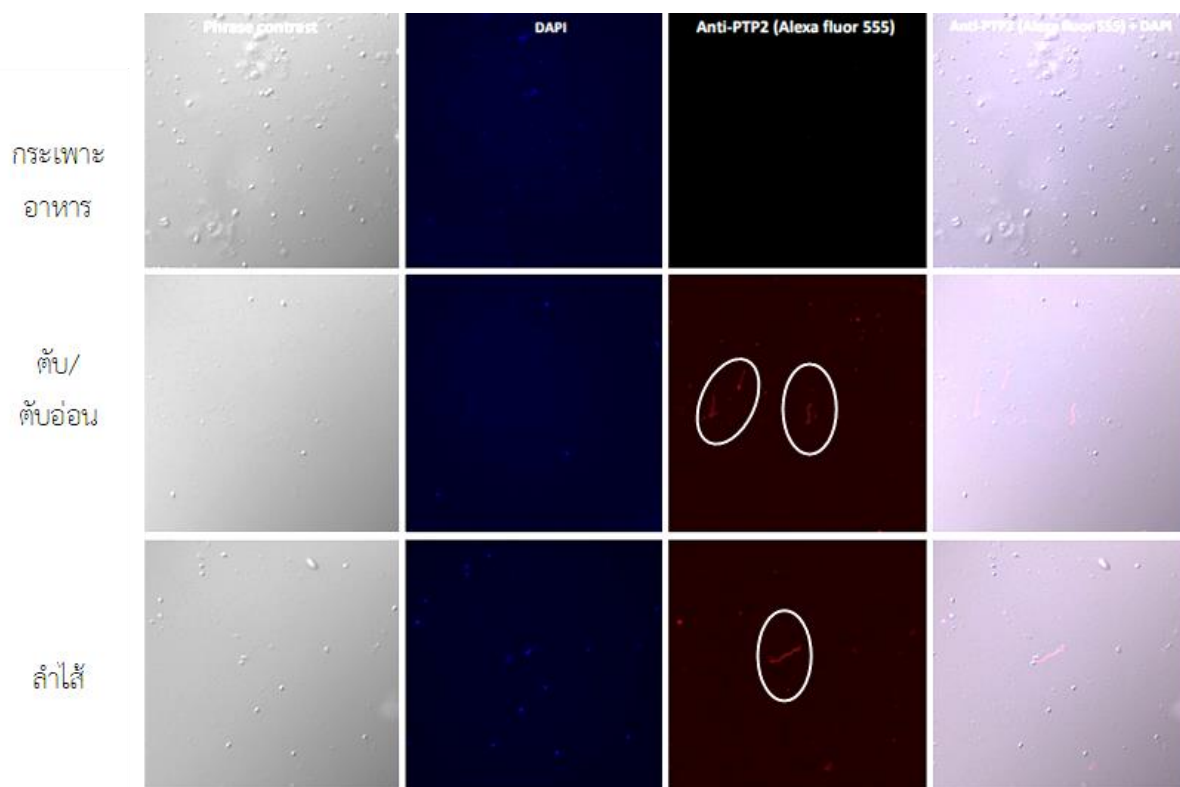
ภาพที่ 12 แสดงระดับ pH ที่วัดได้ในทางเดินอาหารของกิ้งก่า โดยวัดที่กระเพาะอาหาร ตับและลำไส้กิ้งก่าที่ไม่ติดเชื้อ EHP

เพื่อให้เข้าใจกลไกการติดเชื้อผ่านทางสปอร์ จะอาศัยผลการศึกษาดังกล่าวโดยใช้วิธีติดตามสารพันธุกรรมของเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค in situ hybridization ในเบื้องต้นพบว่ากิ้งก่าที่ติดเชื้อ EHP จะพบสารพันธุกรรมของเชื้อในส่วนเนื้อเยื่อตับเท่านั้น (ภาพที่ 13) ไม่พบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อในตำแหน่งอื่นของทางเดินอาหารกิ้งก่า จากผลการตรวจนี้ทำให้สันนิษฐานว่า การติดเชื้อ EHP ในกิ้งก่าผ่านทางการงอกของสปอร์น่าจะเกิดในส่วนของเนื้อเยื่อเซลล์ตับเป็นหลัก



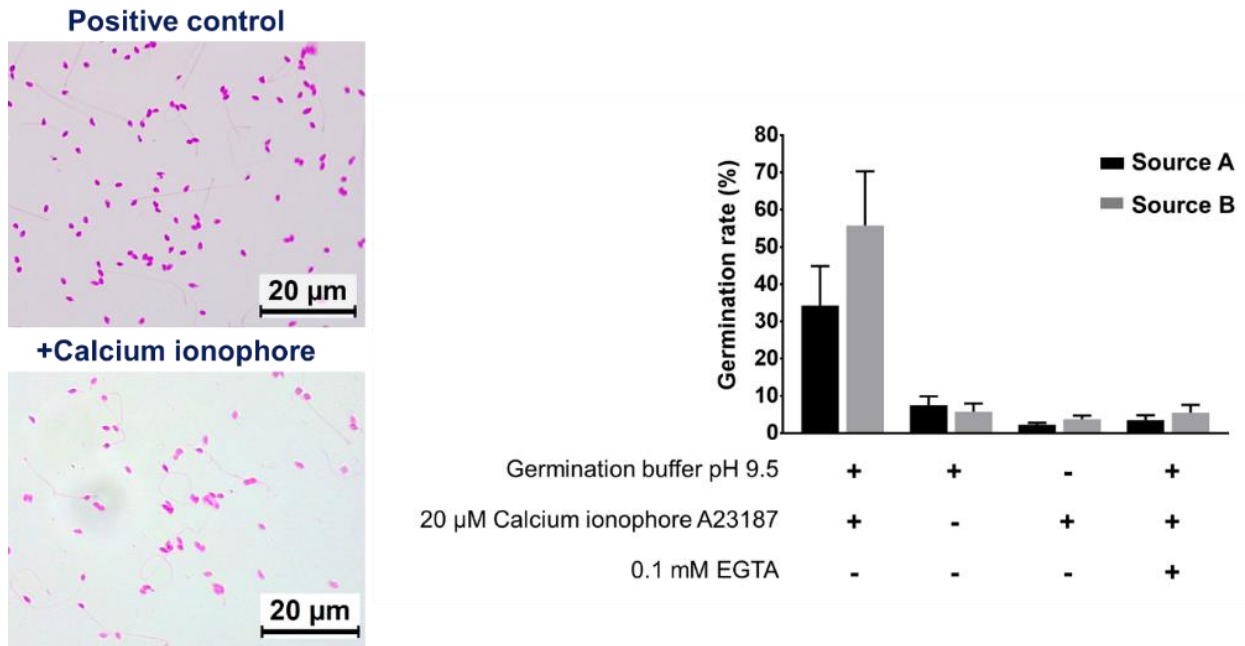
ภาพที่ 13 การตรวจติดตามสารพันธุกรรมเชื้อ EHP ด้วยวิธี in situ hybridization ในกิ้งก่าที่ติดเชื้อ EHP จะพบตำแหน่งของเชื้อ EHP ในส่วนของเซลล์ตับเป็นหลัก (ลูกศร) ไม่พบที่กระเพาะอาหารหรือส่วนอื่นของทางเดินอาหาร (AMC; anterior midgut caecum, HP; hepatopancreas, Int; Intestine)

การทดลองต่อมาพบเพิ่มเติมว่านอกจากตับแล้ว ยังพบการงอกของสปอร์ได้ลำไส้เป็นอวัยวะเป้าหมาย สำหรับการงอกของสปอร์ของเชื้อ EHP โดยนำกุ้งติดเชื้อ EHP มาทำการแยกกระเพาะอาหาร ตับ และลำไส้ หลังจากนั้นแยกสปอร์ออกมาจากอวัยวะเหล่านี้โดยการใช้เทคนิค Percoll gradient Centrifugation (Aldama-Cano et al., 2018) นำสปอร์ที่แยกได้จากอวัยวะต่างๆมาตรวจด้วยเทคนิค Immunofluorescence โดยใช้ antibody ต่อ polar tube protein 2 ที่สร้างขึ้น ผลการทดลองพบสปอร์ที่งอกเฉพาะในตับและลำไส้เท่านั้น ไม่พบสปอร์ที่งอกในกระเพาะอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงผลการตรวจหาสปอร์ที่มีการงอกในอวัยวะของทางเดินอาหารของกุ้งด้วยเทคนิค Immunofluorescence สปอร์ที่งอกแล้วอยู่ในวงสีขาว พบสปอร์ที่งอกแล้วในตับและลำไส้เท่านั้น

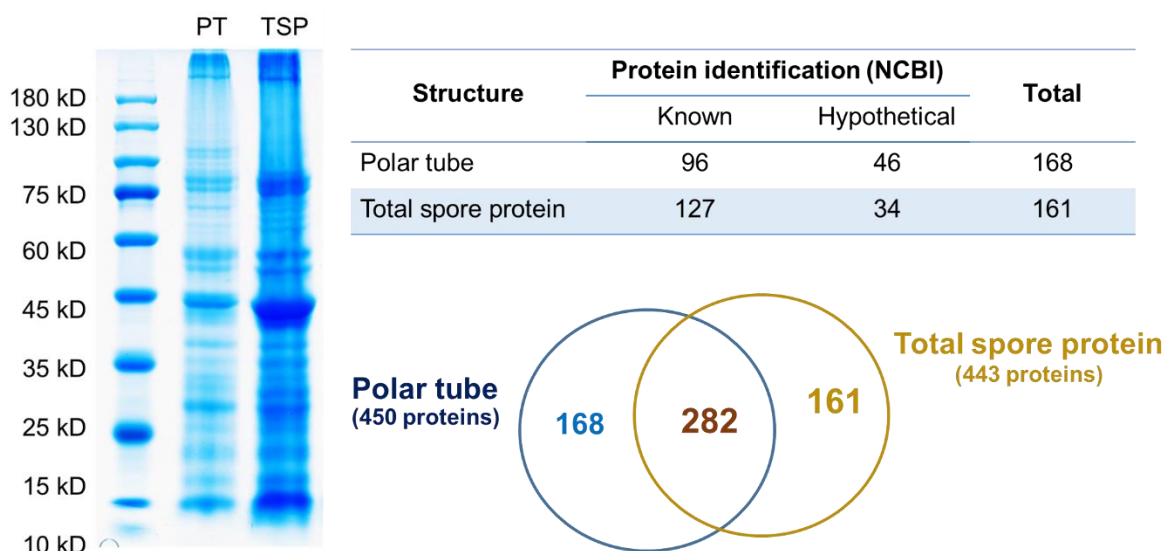
กลไกการกระตุ้นการงอกโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของ pH ยังไม่ทราบแน่ชัดในกรณีเชื้อ EHP การทดสอบโดยการเติม Calcium ionophore (20 μ M Calcium ionophore A23187) เข้าไปใน buffer ที่มี pH สูง (9.5) ทำให้มีการงอกของสปอร์มากขึ้นกว่าการใช้ buffer ที่มี pH สูงอย่างเดียวหรือ การเติม Calcium ionophore ดังแสดงในภาพที่ 15 การเติม Ca^{2+} chelating agent (0.1 mM EGTA) ยับยั้งการงอกของสปอร์ ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่าการงอกของสปอร์เชื้อ EHP เกิดขึ้นที่ตับและลำไส้ของกุ้ง และการงอกถูกกระตุ้นด้วย pH สูง (≥ 8) และปริมาณ Ca^{2+} Influx



ภาพที่ 15. แสดงการงอกของสปอร์เชื้อ EHP ที่ถูกกระตุ้นด้วย buffer ที่มี pH 9.5 และ 20 µM Calcium ionophore A23187 และถูกยับยั้งด้วยสาร Chelating agent (EGTA)

3.2 งานวิจัยเพื่อศึกษาโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ polar tube extrusion ของสปอร์เชื้อ EHP

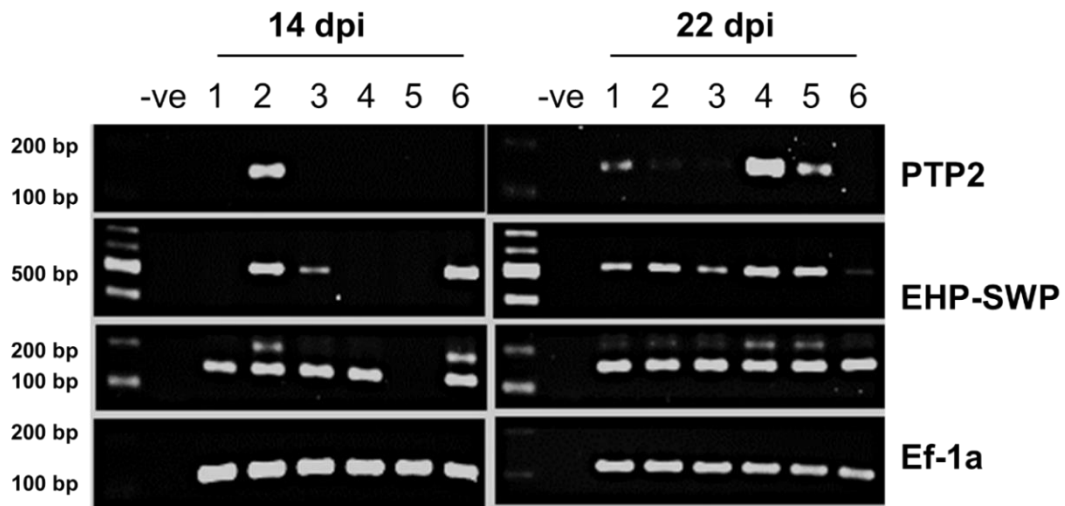
ในการเข้าใจกลไกการก่อโรคของเชื้อ EHP จำเป็นต้องมียุทธศาสตร์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการงอกของสปอร์ จึงได้ทำการเตรียมสารละลายโปรตีนของสปอร์ 2 แบบคือ สารละลายโปรตีนจากสปอร์ทั้งหมด (Total spore protein, TSP) และโปรตีนของ polar tube (เตรียมโดยกระตุ้นให้เกิดการงอก และละลายโปรตีนที่อยู่บน polar tube โดยที่สปอร์ไม่แตก, PT) นำสารละลายโปรตีนทั้งสองแบบมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ดังแสดงในภาพที่ 16 ผลการวิเคราะห์โปรตีนรวมโดยใช้เทคนิค Mass Spectrometry ได้ candidate proteins ทั้งสิ้น 443 และ 450 โปรตีนจาก TSP และ PT ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบ พบว่ามีโปรตีนที่จำเพาะต่อ polar tube ทั้งสิ้น 168 โปรตีน โดยแบ่งเป็นโปรตีนที่ทราบหน้าที่แล้วในเชื้อไมโครสปอริเดียนชนิดอื่น 96 โปรตีน โปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แต่มีรายงานแล้วจำนวน 46 โปรตีน และโปรตีนที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน 26 โปรตีน



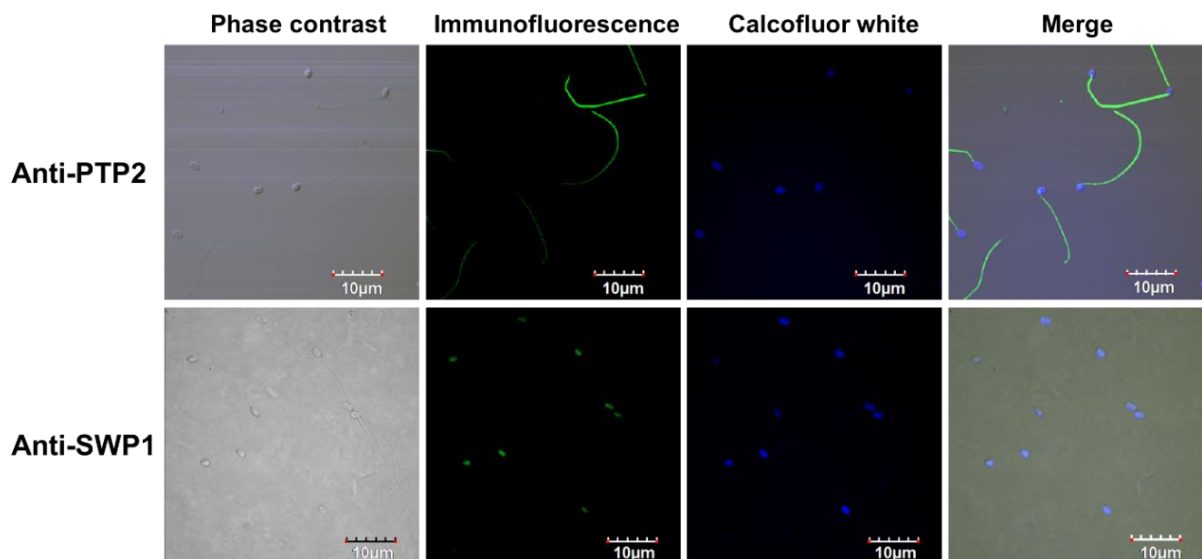
ภาพที่ 16 แสดงผลการวิเคราะห์ protein profiles ของ total spore protein (TSP) และ polar tube protein (PT) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Mass spectrometry พบจำนวนโปรตีนที่เหมือนกัน 282 โปรตีน และเป็นโปรตีนที่จำเพาะต่อสปอร์ 161 โปรตีน และจำเพาะต่อ polar tube 168 โปรตีน

โปรตีน Polar tube protein 2 (PTP2) เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP

ผลการวิเคราะห์โปรตีนของ polar tube พบ candidate ที่มีกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับโปรตีน polar tube protein 2 (PTP2) ซึ่งพบในเชื้อ microsporidian ชนิดอื่น (Polonais, V., et al 2013) โดยโปรตีนชนิดนี้เป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักของโครงสร้าง polar tube และมีบทบาทสำคัญในการช่วยถ่าย sporoplasm เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในกรณีเชื้อ EHP ยังไม่มีการรายงานหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ การศึกษาในระดับยีนพบว่าการแสดงออกของ PTP2-like ของเชื้อ EHP จะสูงในกึ่งที่ติดเชื้อในปริมาณมากในวันที่ 22 หลังการเลี้ยงร่วม (ภาพที่ 17) การศึกษาเพื่อระบุตำแหน่งของโปรตีน PTP2 โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ (anti-PTP2) พบว่าโปรตีน PTP2 น่าจะเป็นโปรตีนองค์ประกอบหลักตัวหนึ่งในโครงสร้าง polar tube โดยผลการย้อมสปอร์ EHP ที่กระตุ้นให้งอก จะพบการเกาะกุกตัวของโปรตีน PTP2 ตลอดท่อ polar tube ของสปอร์ที่งอก (ภาพที่ 8) แต่จะไม่พบ PTP2 รอบๆ โครงสร้างสปอร์ (เปรียบเทียบกับผลการย้อมโปรตีน spore wall protein 1 (SWP1) ซึ่งจะพบการเกาะกุกตัวของ SWP1 รอบโครงสร้างสปอร์)

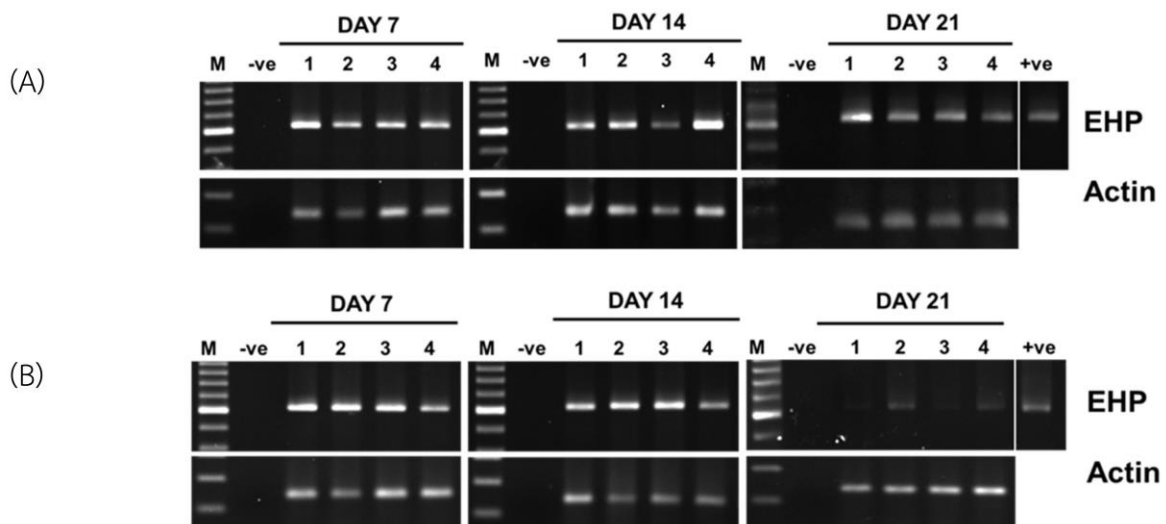


ภาพที่ 17 ผลการวัดปริมาณยีน PTP2 ในกึ่งที่มีการติดเชื้อ EHP โดยวิธี RT-PCR ใน 2 ช่วงเวลาหลังการเลี้ยงร่วม พบว่ายีน PTP2 จะแสดงออกสูงในระยะ 22 วันหลังการติดเชื้อ และสัมพันธ์กับปริมาณการเพิ่มจำนวนของตัวเชื้อ EHP



ภาพที่ 18 การระบุตำแหน่งโปรตีน PTP2 โดยใช้วิธี immunofluorescence ใน spore เชื้อ EHP ที่กระตุ้นให้งอกและย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน PTP2 พบว่าโปรตีน PTP2 จะมีตำแหน่งอยู่รอบโครงสร้าง polar tube โดยส่วนใหญ่ (ภาพ immunofluorescence แสดงสัญญาณโปรตีน PTP2 เป็นสีเขียว) และจะไม่พบที่เม็ดสปอร์ ซึ่งต่างจากโปรตีน spore wall protein 1 ที่พบเฉพาะโครงสร้างของเม็ดสปอร์เป็นหลัก (ภาพ immunofluorescence แสดงสัญญาณโปรตีน SWP1 สีเขียวรอบเม็ดสปอร์) ภาพถ่าย immunofluorescence ถ่ายด้วยกล้อง confocal กำลังขยาย 600 เท่า

การศึกษาเพื่อเข้าใจกลไกการการก่อโรคของเชื้อ EHP และหาแนวทางในการยับยั้งเชื้อในกุ้ง โดยอาศัยข้อมูลการค้นพบยีนที่สร้างโปรตีนPTP2 ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในกลไกการก่อโรคหรือการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในเซลล์กุ้ง ในเบื้องต้นอาศัยหลักการยับยั้งการแสดงออกของยีน PTP2 โดยการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) และฉีดเข้ากุ้งที่ติดเชื้อ EHP ซึ่งรูปแบบการฉีด dsRNA (10 μ g ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม) จะฉีดเข้ากล้ามเนื้อและกำหนดจำนวนครั้งของการฉีดทั้งหมด 3 ครั้ง ในแต่ละครั้งจะห่างกันประมาณ 7 วัน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ว่าถ้ายับยั้งการแสดงออกของ PTP2 ได้ ก็จะทำให้การติดเชื้อ EHP ลดลง ผลการทดลองพบว่า กุ้งที่ฉีด dsRNA-PTP2 มีปริมาณเชื้อ EHP มีที่ลดลง โดยเปรียบเทียบจากปริมาณ DNA ของเชื้อในตัวอย่างโดยวิธี nested PCR (ภาพที่ 19B) ในขณะที่กุ้งที่ติดเชื้อEHP ที่ไม่ได้ฉีด dsRNA ยังคงวัดระดับ DNA ของ EHP ได้สูงอยู่ (ภาพที่ 19A) ผลการทดลองสรุปได้ว่า PTP2 เป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญในการก่อโรคของเชื้อ EHP



ภาพที่ 19 แสดงความสำคัญของการแสดงออกของ PTP2 ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP

(A) การเพิ่มจำนวนของ EHP ในกุ้งที่ติด EHP และไม่ได้รับ dsRNA-PTP2

(B) การเพิ่มจำนวนของ EHP ในกุ้งที่ติด EHP และได้รับ dsRNA-PTP2 ปริมาณ 10 μ g ต่อน้ำหนักกุ้ง 1 กรัม

3.3 แนวทางการแก้ไขปัญหาการติดเชื้อ EHP ในกุ้งจากผลงานวิจัย

จากผลการศึกษาพบว่าการก่อโรคของเชื้อ EHP จากสิ่งแวดล้อมภายนอกเข้าสู่ตัวกุ้งโดยอาศัยสปอร์ที่ออกมาจากกุ้งที่ติดเชื้อ EHP และแพร่กระจายในน้ำในบ่อเลี้ยง การก่อโรคของเชื้อจะเกิดขึ้นได้จากสปอร์ที่มีชีวิตที่สามารถงอกในตับและลำไส้ของกุ้งได้ กระบวนการงอกของสปอร์จึงมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP และก่อโรคในกุ้ง อย่างไรก็ตาม ผลงานวิจัยดังกล่าวทำให้เกิดข้อสงสัยว่าถ้าลูกกุ้งก่อนปล่อยได้รับการตรวจว่า ปลอดภัยจากเชื้อ EHP แต่เมื่อเลี้ยงไประยะเวลาหนึ่งกลับให้ผลบวกในกุ้งจำนวนหนึ่ง ก่อนที่จะมีการ

แพร่กระจายไปทั่วบ่อจากซีกของกุ้งที่ป่วยนั้น สมมติฐานที่ตั้งขึ้นคือ การมี environmental reservoir สำหรับเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยง

3.3.1 ผลการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่สามารถเป็นพาหะเชื้อไมโครสปอริเดียน (*Enterocytozoon hepatopenaei*: EHP) ในบ่อเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อ EHP

ในการศึกษาหาพาหะหรือ environmental reservoir ของเชื้อ EHP จากบ่อเลี้ยงกุ้ง ได้ตั้ง Criteria ในการเลือกบ่อที่จะนำมาศึกษาคือ พบการติดเชื้อ EHP (โดย SWP-PCR) ทั้งในตัวกุ้งและ suspended solid ที่กรองจากน้ำ (200 μ m plankton net) และกุ้งมี ADG \leq 0.1 g/day จากการเก็บตัวอย่างจากบ่อเลี้ยงกุ้ง จำนวน 21 บ่อ พบว่ามีจำนวนบ่อเพียง 3 บ่อที่ผ่าน criteria ที่ตั้งไว้เพื่อศึกษาหาพาหะ ได้แก่บ่อที่ 7 (ER7), 12 (ER12) และ 21 (ER21) ดังแสดงในตารางที่ 2 จึงทำการเพิ่มจำนวน DNA template ของทั้ง 3 บ่อ ด้วย 18s rRNA gene universal primer และส่ง sequencing ผลที่ได้จาก BlastN ภายใต้อาณัติข้อมูล NCBI พบว่า บ่อ ER7 และ ER12 พบ candidate ที่เหมือนกันคือ *Mytilopsis* sp. โดยมี Identities สูงถึง 99% กับ accession no. KX713323.1 (ภาพที่ 20) ส่วน candidate ที่ได้จาก ER21 คือ *Perna* sp. มี Identities เท่ากับ 95% กับ accession no. MK419109.1 (ภาพที่ 21)

Mytilopsis sp. และ *Perna* sp. เป็นหอยสองฝาที่เป็น filter feeder จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อ EHP สามารถเข้าสู่ตัวหอยได้ง่าย ซึ่งในปัจจุบันนี้ ยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับเชื้อ EHP ก่อโรคในหอยสองฝา แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีรายงานของไมโครสปอริเดียนชนิดอื่นที่ถูกพบเจอในหลากหลายที่ในเนื้อเยื่อหอยทะเลสองฝา เช่น connective tissue ของ digestive gland ของหอย Scallop (*Aequipecten opercularis*) (Lohrmann et al. 2000), epithelium ของ digestive gland ของหอย Scallop (*Chlamys varia*) (Bodoy et al. 1991), connective tissue รอบ gut epithelium ของหอยนางรม (*Ostrea lutaria*) (Jones 1981), epithelium ของ stomach ของ clams (*Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra* and *V. rhomboides*) (Villalba et al. 1993a, b) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าชนิดของหอยที่เราตรวจพบสามารถเป็นพาหะของเชื้อ EHP ซึ่งหลังจากผลที่ได้นี้ ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเลือก *Mytilopsis* sp. มาทดสอบการเป็นพาหะของเชื้อ EHP ก่อน เนื่องจากสามารถพบกระจายอยู่ทั่วไปในบ่อเลี้ยงกุ้งและเกือบทั่วทุกพื้นที่การเลี้ยงในประเทศไทย

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลบ่อที่กึ่งติดเชื้อ EHP จำนวน 11 บ่อ และบ่อที่ผ่าน criteria

Code	ADG (g/day)	EHP infection		Passed criteria	<i>Mytilopsis</i> sp.	<i>Perna</i> sp.
		Shrimp	SMO			
ER2	0.19	+	+	×	×	×
ER3	0.26	+	+	×	×	×
ER4	0.19	++	+	×	×	×
ER7	0.08	++	+	√	√	×
ER8	0.32	++	+	×	×	×
ER9	0.36	++	+	×	×	×
ER10	0.38	++	+	×	√	×
ER12	0.08	++	+	√	√	×
ER19	0.22	++	+	×	×	×
ER20	0.18	++	+	×	×	×
ER21	0.10	++	+	√	×	√

Mytilopsis leucophaeata voucher BivAToL-9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: **KX713323.1** Length: 1772 Number of Matches: 1
 Range 1: 290 to 992

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1288 bits (697)	0.0	701/703 (99%)	0/703 (0%)	Plus/Plus
CONSENSUS	1	GCCCTATCAACT T ACGATGGTACGTCATGCCTACCATGGTGATAACGGGTAACGGGGA	60	
KX713323.1	290	GCCCTATCAACT G TCGATGGTACGTCATGCCTACCATGGTGATAACGGGTAACGGGGA	349	
CONSENSUS	61	ATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGACACGGCTACCCATCCAAGGAAGGCAG	120	
KX713323.1	350	ATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGACACGGCTACCCATCCAAGGAAGGCAG	409	
CONSENSUS	121	CAGGCGCGCAAAATTACCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACGAAAATAACAATGCGG	180	
KX713323.1	410	CAGGCGCGCAAAATTACCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGACGAAAATAACAATGCGG	469	
CONSENSUS	181	GACTCTTTCGAGGCCCGCAATTGGAATGGGCACACTTTAGATCCTTGAGCGAGGATCGA	240	
KX713323.1	470	GACTCTTTCGAGGCCCGCAATTGGAATGGGCACACTTTAGATCCTTGAGCGAGGATCGA	529	
CONSENSUS	241	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAA	300	
KX713323.1	530	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAA	589	
CONSENSUS	301	AGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGCACAGGCTTGCCTCCGCTCG	360	
KX713323.1	590	AGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGCACAGGCTTGCCTCCGCTCG	649	
CONSENSUS	361	CGGCGGTCACCGCTCGCCCTGGCCCTCCCGCCGGCGTCACCGTCCCCTGGTCTCTTGAC	420	
KX713323.1	650	CGGCGGTCACCGCTCGCCCTGGCCCTCCCGCCGGCGTCACCGTCCCCTGGTCTCTTGAC	709	
CONSENSUS	421	CGAGTGTCTCGGGCGCCGGCACGTTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTTAGAGCAGGCC	480	
KX713323.1	710	CGAGTGTCTCGGGCGCCGGCACGTTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTTAGAGCAGGCC	769	
CONSENSUS	481	CTGGTTGCCCTGTATAATTGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATCTGTGG	540	
KX713323.1	770	CTGGTTGCCCTGTATAATTGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATCTGTGG	829	
CONSENSUS	541	CTCTCGGAGCGCGAGGTAATGATTGATAGGGACTGACGGGGGCATCCGTATTGCGGCGCT	600	
KX713323.1	830	CTCTCGGAGCGCGAGGTAATGATTGATAGGGACTGACGGGGGCATCCGTATTGCGGCGCT	889	
CONSENSUS	601	AGAGGTGAAATTCTTGGACCGTCGCAAGACGAACGACAGCGAAAGCATTGCCAAGCATG	660	
KX713323.1	890	AGAGGTGAAATTCTTGGACCGTCGCAAGACGAACGACAGCGAAAGCATTGCCAAGCATG	949	
CONSENSUS	661	TTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTCAGAGGTTCAAGACGATC	703	
KX713323.1	950	TTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTCAGAGGTTCAAGACGATC	992	

ภาพที่ 20 แสดง Consensus sequences ของตัวอย่าง 18S rRNA ของสิ่งมีชีวิตแวนลอยในบ่อ ER7 และ ER12 อ่านผลตรงกับ *Mytilopsis leucophaeata* ที่ accession no. KX713323.1

Perna viridis isolate F3 18S small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, 28S large subunit ribosomal RNA gene, and 28S-18S intergenic spacer, complete sequence

Sequence ID: [MK419106.1](#) Length: 8432 Number of Matches: 1

Range 1: 421 to 938

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
828 bits (448)	0.0	499/523 (95%)	6/523 (1%)	Plus/Plus
Consensus	1	AAATTACCCACTCCGGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTC	60	
MK419106.1	421	AAATTACCCACTCCGGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTC	480	
Consensus	61	GAGGCCCGTAATTGGAATGAGCACACTTTAAACCCCTTGACGAGGATCTATTGGAGGGC	120	
MK419106.1	481	GAGGCCCGTAATTGGAATGAGCACACTTTAAACCCCTTGACGAGGATCTATTGGAGGGC	540	
Consensus	121	AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGC	180	
MK419106.1	541	AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGC	600	
Consensus	181	AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGAICTCGGGTCCCGGCTTGCCTGCGGTCCGGCGCATGTCGGTIC	240	
MK419106.1	601	AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGAICTCGGGTCCCGGCTTGCCTGCGGTCCGGCGCATGTCGGTIC	660	
Consensus	241	AACTGCTCGTCCCGGCCAGTCTTCCCGGTTCCTCGCCCTTGGTGCTCTTGACTGAGTGT	300	
MK419106.1	661	AACTGCTCGTCCCGGCCAGTCTTCCCGGTTCCTCGCCCTTGGTGCTCTTGACTGAGTGT	715	
Consensus	301	CTCGGGTGGCCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCTCGTCGC	360	
MK419106.1	716	CTCGGGTGGCCGGAACGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCAAATCATCGC	775	
Consensus	361	CTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGCTGGTTTTTCGG	420	
MK419106.1	776	CTGAATAATGGTGCATGGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGCTGGTTTTTCGG	835	
Consensus	421	AGCTGGAGGTAATGATTAAGAGGGACTGACGGGGGCATTTCGTATTACGGGTTAGAGGTG	480	
MK419106.1	836	AGCTGGAGGTAATGATTAAGAGGGACTGACGGGGGCATTTCGTATTACGGGTTAGAGGTG	895	
Consensus	481	AAATTCTTGGATCGCCGTAACACGAACTACTGCGACAGC-TTT	522	
MK419106.1	896	AAATTCTTGGATCGCCGTAACACGAACTACTGCGAAAGCATT	938	

ภาพที่ 21 แสดง Consensus sequences ของตัวอย่าง 18S rRNA ของสิ่งมีชีวิตแขวนลอยในบ่อ ER21 อ่านผลตรงกับ *Perna viridis* ที่ accession no. MK419109.1

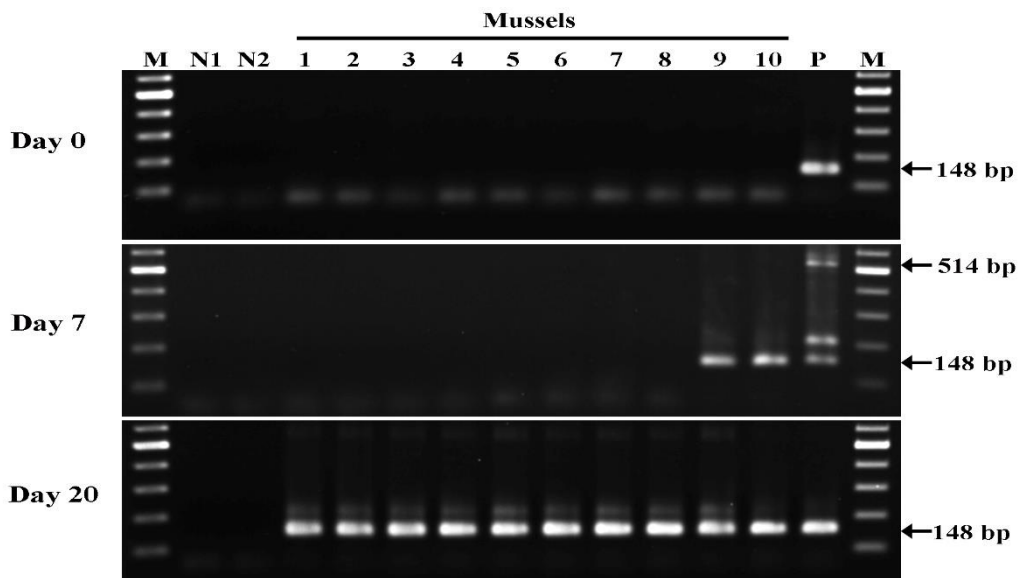
ทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการตรวจสอบกับทางฟาร์มแล้วขอเข้าไปเก็บตัวอย่างหอยในบ่อเลี้ยง เพื่อนำมาจำลองการเลี้ยงร่วมกับกุ้ง (Cohabitation) ในห้องปฏิบัติการที่มหาวิทยาลัยสุโขทัย ซึ่งหอยที่ทางคณะผู้วิจัยเข้าไปเก็บตัวอย่าง เกษตรกรเรียกว่า หอยกะพง สามารถพบได้ในบ่อเลี้ยงกุ้งตามขอบบ่อ พื้นบ่อ และเสาสะพานยอ (ภาพที่ 22) ก่อนเริ่มทำการทดลอง Cohabitation ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการยืนยัน species ของตัวอย่างหอยที่เก็บมาว่าเป็นชนิดเดียวกับที่พบใน ER7 และ ER12 หรือไม่ โดยการส่ง DNA template ของตัวอย่างหอยไปทำ sequencing และผลที่ได้พบว่าเป็น *Mytilopsis* sp. เหมือนกันที่ Accession no. KX713323.1 เดียวกัน มี identities เท่ากับ 99% (ภาพที่ 20) จึงได้ดำเนินการนำหอยไปทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 22 ลักษณะหอยกะพงที่พบบริเวณขอบบ่อและเสาสะพานของบ่อเลี้ยงกุ้ง

3.3.1.1 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ EHP ด้วยวิธี *cohabitation* ระหว่างกุ้งที่ติดเชื้อ EHP และหอยกะพงที่ไม่ติดเชื้อ EHP

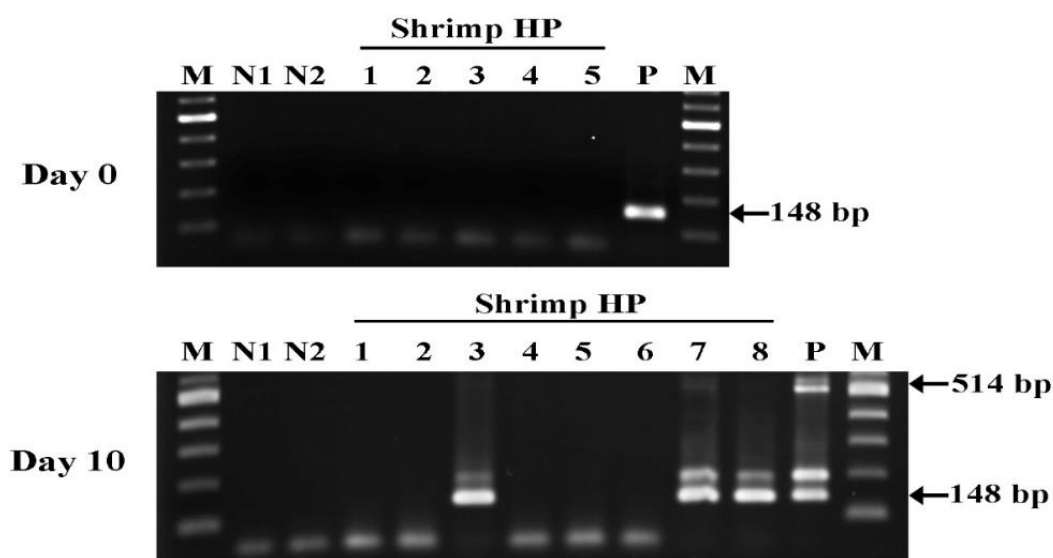
ก่อนเริ่มการทดลอง ไม่พบการติดเชื้อ EHP ในตัวอย่างหอยที่นำมาจากบ่อเลี้ยง (n=10) จากการตรวจด้วย PCR จึงนำหอยไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งที่ติดเชื้อ EHP เป็นระยะเวลา 20 วัน ในวันที่ 7 ของการทดลอง พบว่ามีหอยติดเชื้อ EHP 20% (2/10) จากการตรวจด้วยเทคนิค PCR และในวันที่ 20 พบความชุกของการติดเชื้อ EHP เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยพบการติดเชื้อ EHP เป็น 100% (10/10) ในระดับ light infection (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ภาพ Gel electrophoresis ของการทดลอง *cohabitation* ระหว่างกุ้งที่ติดเชื้อ EHP และหอยกะพงปลอดเชื้อ ณ วันที่ 0, 7 และ 20 ของการทดลอง ขนาดของแถบ nested PCR เท่ากับ 148 bp M: 2 log marker N1, N2: Negative control ของ first และ nested PCR step ตามลำดับ 1-10: ตัวอย่างหอยกะพงที่เลี้ยงร่วมกับกุ้งที่ติดเชื้อ EHP, P: EHP pure fragment of positive control

3.3.1.2 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ EHP ด้วยวิธี cohabitation ระหว่างหอยกะพงติดเชื้อ EHP และ กุ้งที่ไม่ติดเชื้อ EHP

ก่อนเริ่มการทดลองดำเนินการตรวจการติดเชื้อ EHP ในกุ้ง จำนวน 5 ตัว ไม่พบการติดเชื้อ EHP (0/5) จากการตรวจด้วยเทคนิค PCR หลังจากเลี้ยงร่วมกับหอยที่ติดเชื้อ EHP เป็นระยะเวลา 10 วัน สุ่มเก็บตัวอย่าง กุ้งจำนวน 8 ตัว พบการติดเชื้อ EHP จำนวน 3 ตัว คิดเป็น 37.5% (ภาพที่ 24) จากผลการทดสอบการเลี้ยง ร่วมทั้ง 2 การทดลอง สรุปได้ว่ากุ้งที่ติดเชื้อ EHP สามารถถ่ายทอดเชื้อสู่หอยกะพงได้ และหอยกะพงที่ติดเชื้อมี ความสามารถถ่ายทอดสู่กุ้งได้ ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาพร้อมด้วย เพื่อยืนยันลักษณะ การติดเชื้อ EHP ในหอยว่าเป็นแบบ Infectious carrier หรือ mechanical carrier

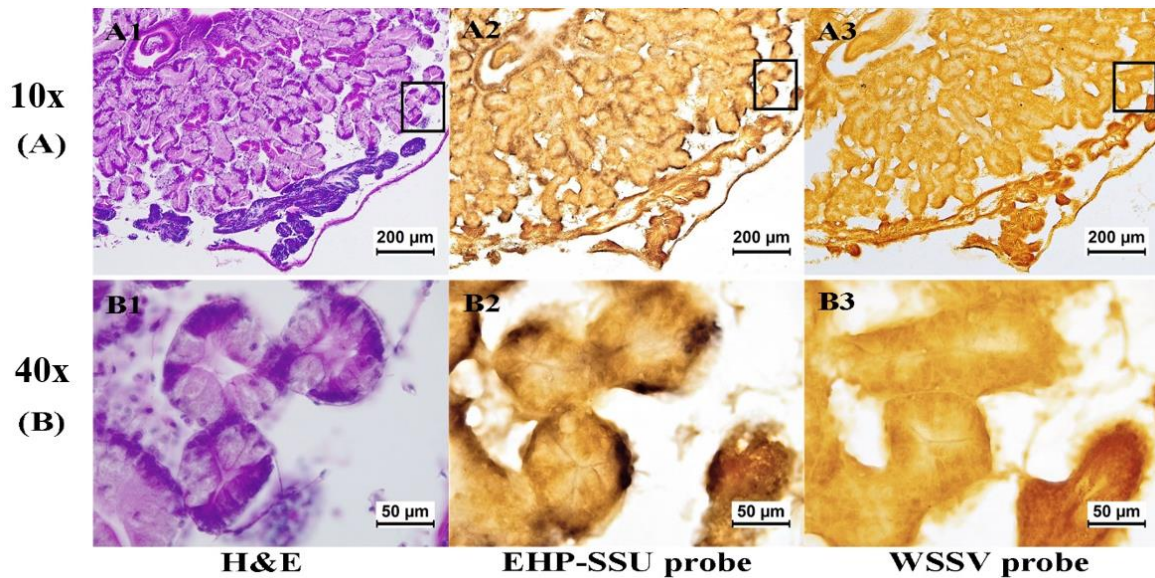


ภาพที่ 24 ภาพ Gel electrophoresis ของการทดลอง cohabitation ระหว่างหอยที่ติดเชื้อ EHP และ กุ้งปลอดเชื้อ ณ วันที่ 0 และ 10 ของการทดลอง ขนาดของแถบ nested PCR เท่ากับ 148 bp M: 2 log marker N1, N2: Negative control ของ first และ nested PCR step ตามลำดับ 1-5 และ 1-10: ตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงร่วมกับหอยกะพงที่ติดเชื้อ EHP วันที่ 0 และ 10 ตามลำดับ P: EHP pure fragment of positive control

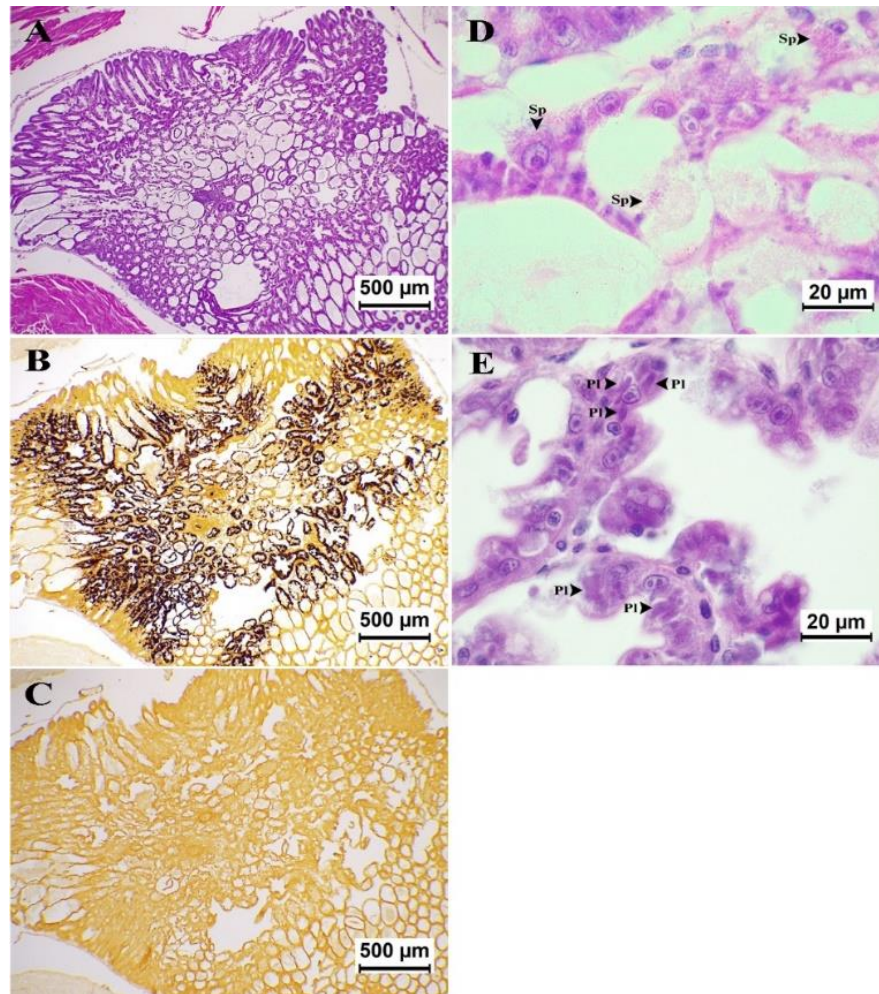
3.3.1.3 ผลการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ผลจากการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อหอยกะพงที่ติดเชื้อ EHP ด้วยเทคนิคการย้อม ด้วยสี H&E ไม่พบสปอร์ หรือระยะอื่นๆ ของ EHP ในทุกอวัยวะ ได้แก่ gill, gonad, testis, digestive organ, intestine และ stomach ตรงกันข้ามกับผลของ *in situ* hybridization ด้วย SSU probe พบว่า สไลด์ที่ตัด ต่อเนื่องกับสไลด์ที่ย้อมสี H&E ให้ผลบวกในเนื้อเยื่อของอวัยวะ digestive gland สังเกตได้จากสีน้ำตาลเข้มจน เกือบดำที่พบในเซลล์ Epithelium ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ยืนยันความจำเพาะของ probe ด้วยการใช WSSV 447 probe ในการตรวจร่วมด้วย โดยสไลด์ที่ถูกบ่มด้วย WSSV probe นั้นไม่พบ positive signal ใดๆ ในทุก

อวัยวะของหอย (ภาพที่ 25) สำหรับกึ่งในการทดลองที่ 2 ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบว่าตับของกุ้งที่ติดเชื้อ EHP มีสปอร์ และ plasmodium อยู่ภายใน Epithelium tubule สอดคล้องกับการ ทำ ISH ซึ่งพบ positive signal ของการติดเชื้อ EHP จำนวนมากกระจายอยู่ภายในเซลล์เยื่อบุท่อตับ (ภาพที่ 26)



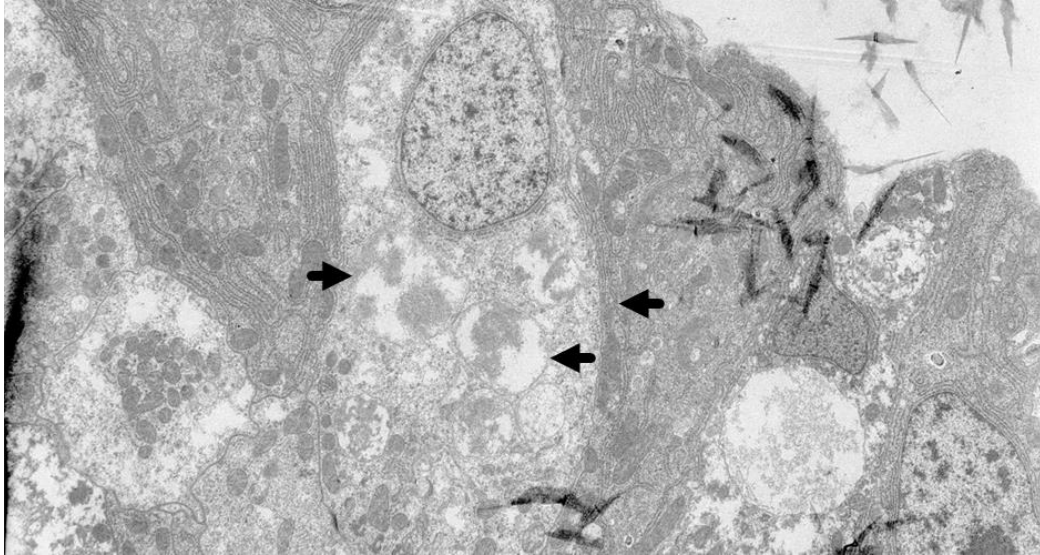
ภาพที่ 25 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ digestive organ ของหอยกะพงที่ติดเชื้อ EHP ที่กำลังขยาย 10X และ 40X เนื้อเยื่อ digestive gland ไม่พบเชื้อ EHP อยู่ภายในเซลล์ (A1 และ B1) แต่พบ positive signal จากการทำ *in situ* hybridization (A2 และ B2) การตรวจยืนยัน specificity ของ SSU probe ด้วย WSSV probe ไม่พบ signal ในที่ที่พบจากการตรวจด้วย SSU probe (A3 และ B3)



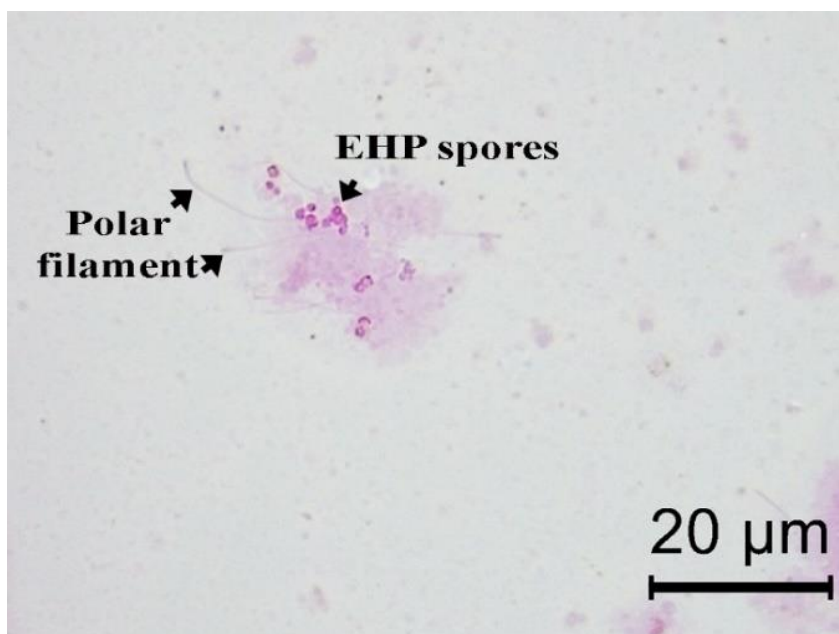
ภาพที่ 26 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับกึ่งที่ติดเชื้อ EHP จากการย้อมสี H&E และ *in situ* hybridization A,B และ C: เนื้อเยื่อของกึ่งที่ตัดติดต่อกันเพื่อศึกษาด้วยการย้อม H&E, *in situ* hybridization ด้วย SSU probe และ WSSV probe ตามลำดับ, D และ E: ตับกึ่งที่ติดเชื้อ EHP พบลักษณะของ spore (Sp) และ plasmodium (Pl) ในเซลล์เยื่อบุตับจำนวนมาก สอดคล้องกับผล *in situ* hybridization ที่ตรวจด้วย SSU probe แสดง positive signal จำนวนมาก (B)

จากการที่ไม่พบระยะใดๆ ของ EHP ในเนื้อเยื่อของหอยที่ติดเชื้อเลย ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการศึกษา TEM และ wet mount เพื่อยืนยันการมีชีวิตอยู่ของ EHP ในเนื้อเยื่อหอย ผลจากการศึกษา TEM ไม่พบลักษณะของเชื้อ EHP ในเซลล์ของ digestive gland แต่พบเพียง vesicle หรือ degraded material ในเซลล์เท่านั้น (ภาพที่ 27) ซึ่งการที่ ISH พบ positive signal อาจเกิดจาก probe ไปจับกับเศษซากของ EHP ที่ถูกย่อยก็เป็นไปได้ แต่ทำไมกึ่งจึงสามารถติดเชื้อ EHP จากการเลี้ยงร่วมกับหอยที่ติดเชื้อ EHP จากการตรวจด้วย PCR ได้ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำ wet mount ของอวัยวะ digestive gland ด้วยการย้อมสี Phloxine B ผลที่ได้กลับพบสปอร์ EHP อยู่ในเนื้อเยื่อของหอย และเป็น active spore เนื่องจากพบการงอกของ polar filament (ภาพที่ 28) นั่นหมายถึง EHP สามารถอาศัยอยู่ภายใน digestive

gland ได้ระยะหนึ่ง โดยไม่สามารถ infect เข้าสู่เซลล์ได้ อย่างไรก็ตามตัวสปอร์ยังสามารถมีชีวิตอยู่ และอาจเข้าสู่ตัวกุ้งได้หากถูกขับถ่ายออกจากตัวหอย จากผลที่ได้ข้างต้นจึงสามารถสรุปได้ว่าหอยกะพงมีความสามารถเป็น mechanical carrier ของเชื้อ EHP ได้



ภาพที่ 27 การศึกษาเนื้อเยื่อของหอยกะพงที่ติดเชื้อ EHP ด้วยวิธี Transmission electron microscopy (TEM) ไม่พบลักษณะของเชื้อ EHP ในเซลล์ของ digestive gland แต่พบเพียง vesicle ที่บรรจุ degraded material ที่อยู่ภายในเซลล์เท่านั้น (ศรีชัย)

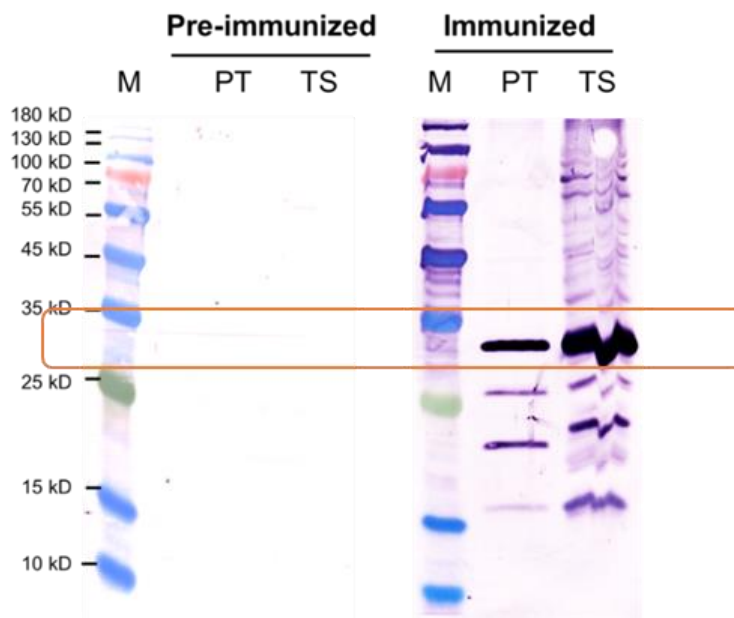


ภาพที่ 28 การตรวจ digestive organ ด้วยวิธี wet mount พบสปอร์ของเชื้อ EHP ที่มีชีวิตจากการแสดงการงอก polar filament ของสปอร์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)

3.3.2 การทดลองยับยั้งการทำงานของโปรตีน PTP2 ด้วยแอนติบอดี IgY

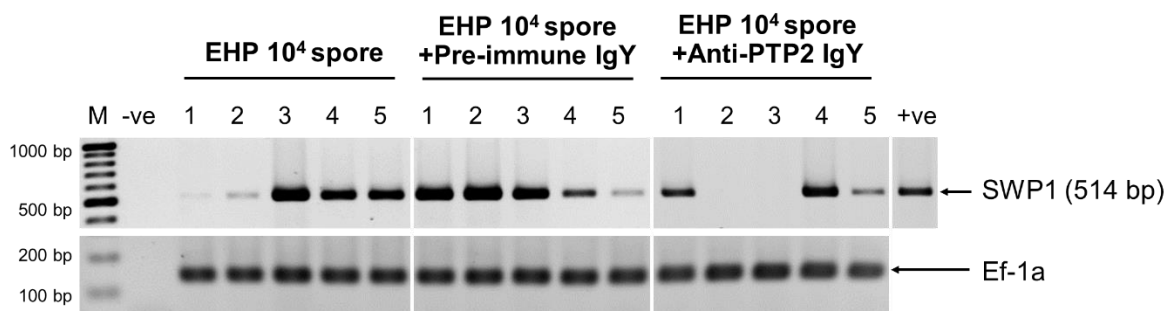
จากผลงานวิจัยที่พบว่าโปรตีน PTP2 มีความสำคัญต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อ EHP จึงเกิดแนวคิดที่ว่าถ้าสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนตัวนี้ได้ ก็น่าจะป้องกันการก่อโรคของเชื้อ EHP ได้

แนวคิดการใช้แอนติบอดี IgY จากไข่ไก่สำหรับการป้องกันโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำ เริ่มมีการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการและผลการทดสอบมีแนวโน้มสามารถนำ IgY ไปใช้สำหรับการลดการติดเชื้อในสัตว์น้ำได้ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม vibrio และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ข้อดีของการใช้ IgY คือสามารถผลิตได้ในปริมาณที่มาก ไม่จำเป็นจะต้องฆ่าไก่เนื่องจาก IgY สามารถสกัดได้จากไข่ไก่ ดังนั้นจึงสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตได้ และมีโอกาสที่เกษตรกรจะสามารถผลิตใช้ได้เองภายในฟาร์ม เนื่องจากกระบวนการที่ไม่ซับซ้อน หลังการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง IgY-PTP2 แล้ว ได้นำ IgY ที่ผลิตได้มาทดสอบว่าสามารถจับอย่างจำเพาะกับ PTP2 ในสปอร์ของเชื้อ EHP ได้หรือไม่ ผลการศึกษาพบว่า IgY-PTP2 ที่สร้างขึ้นสามารถจับกับโปรตีน EHP-PTP2 ได้อย่างจำเพาะเจาะจง ดังแสดงในภาพที่ 29



ภาพที่ 29 ผลการตรวจความจำเพาะของ IgY-PTP2 ที่สร้างขึ้น โดยใช้เทคนิค Western Blot analysis พบว่าสามารถตรวจพบ PTP2 ใน TSP และ PT ได้ โดยโปรตีน EHP-PTP2 มีขนาดประมาณ 31 kDa

เมื่อนำ IgY-PTP2 ที่ผลิตขึ้นผสมกับสปอร์ของเชื้อ EHP (EHP spore + Anti-PTP2 IgY) ฉีดเข้าไปในตั๊กงู ตามวิธีของ Li และคณะ (Li Z., et al. 2012) โดยมี control เป็นการฉีดสปอร์ของเชื้อ EHP (EHP spore) และ สปอร์ผสมกับpreimmune IgY (EHP spore + preimmune IgY) ผลการทดลองแสดงไว้ดังภาพที่ 30 โดยพบแนวโน้มของการลดลงของเชื้อ EHP ในกลุ่มที่ฉีด EHP spore + IgY-PTP2 ซึ่งจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

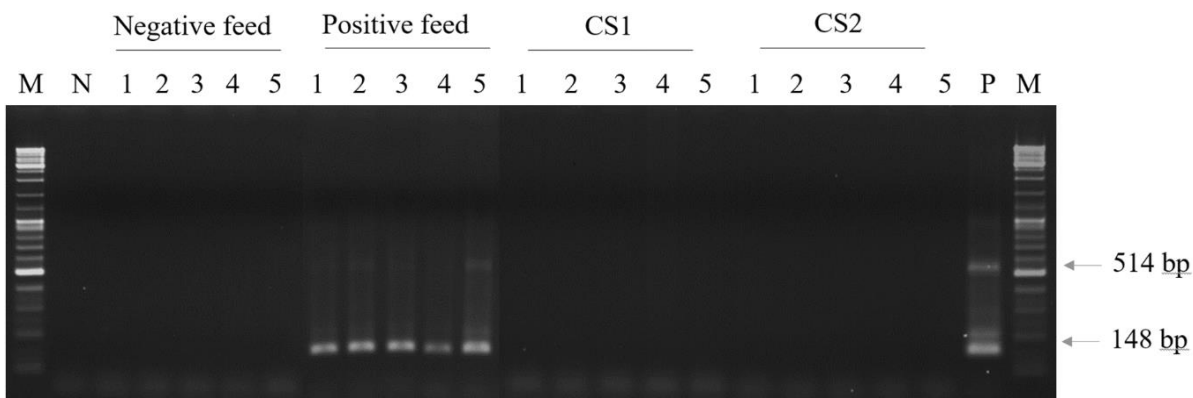


ภาพที่ 30 แสดงผลการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP โดยใช้ SWP-PCR การทดลองการใช้ IgY-PTP2 ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในกุ้ง โดยแบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ประกอบด้วยกลุ่มที่ได้รับสปอร์ของเชื้อ EHP อย่างเดียว (EHP spore) กลุ่มที่ได้รับสปอร์ของเชื้อพร้อมกับ pre-immune IgY (EHP spore+ Pre-immune) และกลุ่มที่ได้รับสปอร์ร่วมกับ IgY-PTP2 (EHP spore + Anti-PTP2 IgY)

3.3.3 การทดสอบอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่ผ่านกระบวนการผลิตที่ผ่านความร้อน $\geq 75^{\circ}\text{C}$

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น บ่งชี้ว่าถ้านำสปอร์ของเชื้อ EHP ผ่านความร้อนที่ 75°C นาน 45-60 วินาที จะทำให้สปอร์ไม่สามารถงอกได้และไม่สามารถก่อโรคได้

การทำงานวิจัยเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อ EHP ในอาหารกุ้งที่ขายตามท้องตลาดและมีรายงานว่าตรวจพบ EHP positive โดยการตรวจด้วย SWP-PCR ในงานวิจัยนี้ได้นำอาหารกุ้ง (CS1 และ CS2) ดังกล่าวมาเลี้ยงกุ้ง ควบคุมไปกับอาหารกุ้งที่ใส่สปอร์ที่สามารถงอกได้ (positive control) และอาหารกุ้งที่ใส่สปอร์ที่ผ่านความร้อนที่ 75°C 1 นาที (negative control) หลังจากเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารดังกล่าวไปเป็นเวลา 2 อาทิตย์ นำกุ้งแต่ละกลุ่มมาตรวจหาการติดเชื้อ EHP ผลการตรวจแสดงไว้ดังภาพที่ 31 โดยพบการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมสปอร์มีชีวิตเท่านั้น จึงต้องระวังว่าอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ระหว่างกระบวนการผลิตมีการให้ความร้อนที่สูงกว่าหรือเท่ากับ 75°C และระยะเวลาที่เหมาะสม ถึงแม้ว่าจะพบ PCR positive อาจเป็นเพียงซาก DNA ของเชื้อ EHP เท่านั้น ไม่สามารถก่อโรคได้

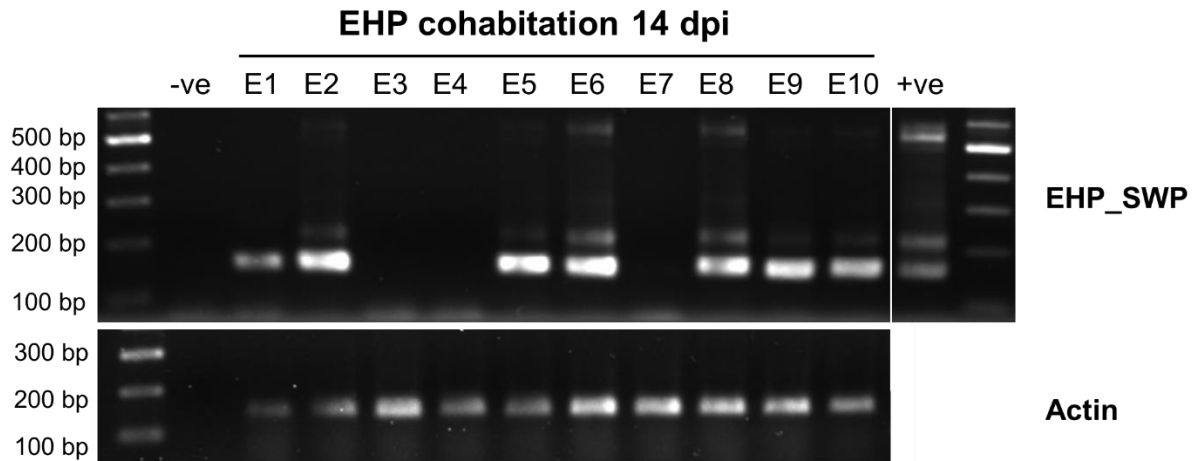


ภาพที่ 31 แสดงผลการตรวจเชื้อ EHP ด้วยวิธี SWP-PCR ภายหลังจาก 21 วันที่ให้อาหารต่างชนิดกัน โดยกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมสปอร์ที่มีชีวิต (Positive feed) กลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมสปอร์ที่ตายแล้ว โดยการผ่านความร้อนที่ 75 °C นาน 1 นาที (Negative feed) กลุ่มที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาด และตรวจพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อ EHP ด้วยวิธี PCR

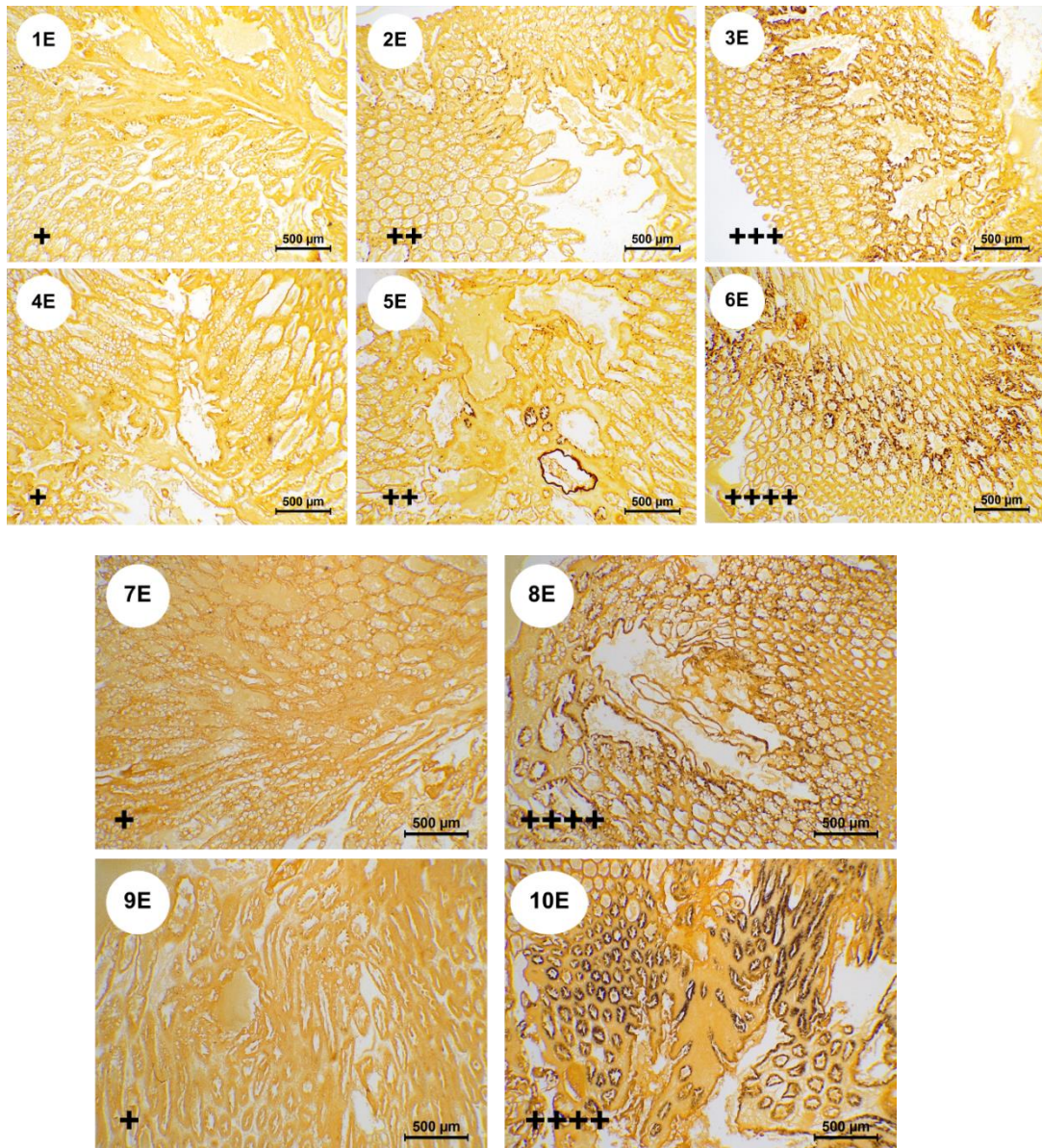
3.3.4 แนวทางการพัฒนากุ้งต้านเชื้อ EHP

การศึกษานี้อาศัยข้อมูลจากการทดสอบการติดเชื้อในกุ้งขาว ผลเบื้องต้นในการตรวจหาเชื้อโดยวิธี nested PCR จะพบว่ามีกุ้งบางส่วนตรวจไม่พบการติดเชื้อ ในขณะที่กุ้งอีกกลุ่มหนึ่งจะพบการติดเชื้อในปริมาณมาก

ผลการตรวจนี้จึงนำไปสู่คำถามว่าความไวต่อการติดเชื้อในลูกกุ้งแต่ละสายพันธุ์อาจจะไม่เท่ากัน และน่าจะมีลูกกุ้งที่มาจากบางแหล่งที่สามารถต้านการติดเชื้อได้ดีกว่ากุ้งกลุ่มอื่น คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะแยกลักษณะสายพันธุ์กุ้งที่ต้านการติดเชื้อ EHP ได้ดี ซึ่งในอนาคตอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์กุ้งที่ทนต่อการติดเชื้อ EHP ได้ โดยเบื้องต้นจะอาศัยข้อมูลลักษณะพันธุกรรมเฉพาะคือ microsatellite marker เพื่อจำแนกสายพันธุ์กุ้ง ผลการทดสอบเบื้องต้นโดยสุ่มตัวอย่างกุ้งที่เลี้ยงร่วมกับกุ้งที่ติดเชื้อ EHP ณ วันที่ 14 และ 16 หลังการเลี้ยงร่วม มาทดสอบหาการติดเชื้อโดยวิธี nested PCR และ in situ hybridization โดยวัดปริมาณสารพันธุกรรม EHP ที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างกุ้ง ผลการตรวจหาเชื้อ EHP ด้วยวิธี PCR ให้ผลบวกในตัวอย่างกุ้งเกือบทุกตัวที่สุ่ม อย่างไรก็ตาม มีบางตัวที่ให้ผลลบ (ภาพที่ 32) การตรวจยืนยันผลด้วยวิธี in situ hybridization พบว่าสามารถจำแนกระดับการติดเชื้อ EHP ในกุ้งได้ 2 แบบคือ ติดเชื้อ EHP ในตับมาก และไม่ติดเลยหรือพบน้อยมาก (ภาพที่ 33) โดยสัดส่วนกุ้งที่ติดมากกับติดน้อยหรือไม่พบเชื้อเลยประมาณ 1:1 จากผลการทดสอบนี้ทำให้สันนิษฐานว่าอาจจะมีกุ้งสายพันธุ์ที่ต้านการติดเชื้อ EHP ได้ในชุดตัวอย่างกุ้งที่ทดสอบ การศึกษาต่อไปคือคัดแยกสายพันธุ์กุ้ง 2 กลุ่มที่ติดเชื้อต่างกันโดยใช้วิธีตรวจหา microsatellite marker ซึ่งคณะผู้วิจัยคาดหวังว่า microsatellite marker จะบ่งชี้รูปแบบประชากรกุ้งระหว่างกุ้งที่ไวต่อการติดเชื้อและกุ้งที่ต้านติดเชื้อได้ ก่อนจะนำไปศึกษาต่อในด้านอื่น การทดสอบหา microsatellite marker อยู่ระหว่างการทดลอง



ภาพที่ 32 แสดงผลการตรวจหาระดับการติดเชื้อในลูกกุ้งที่ทดสอบการติดเชื้อ EHP ด้วยวิธี cohabitation โดยตัวอย่างลูกกุ้งทั้ง 10 ตัวมาจากการทดสอบในถังเดียวกัน วิธีการตรวจหาเชื้อ EHP ใช้วิธี PCR ผลการทดสอบแสดงโดยการทำ agarose gel electrophoresis จะพบผลิตภัณฑ์ PCR 2 ขนาด คือ 514 คู่เบสและ 148 คู่เบส ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าในชุดลูกกุ้งที่ทดสอบ cohabitation ในบ่อเดียวกัน มีระดับการติดเชื้อ EHP ที่ไม่เท่ากัน ซึ่งอาจจะบ่งชี้ถึงการต้านทานการติดเชื้อได้มากน้อยต่างกัน ระหว่างลูกกุ้ง



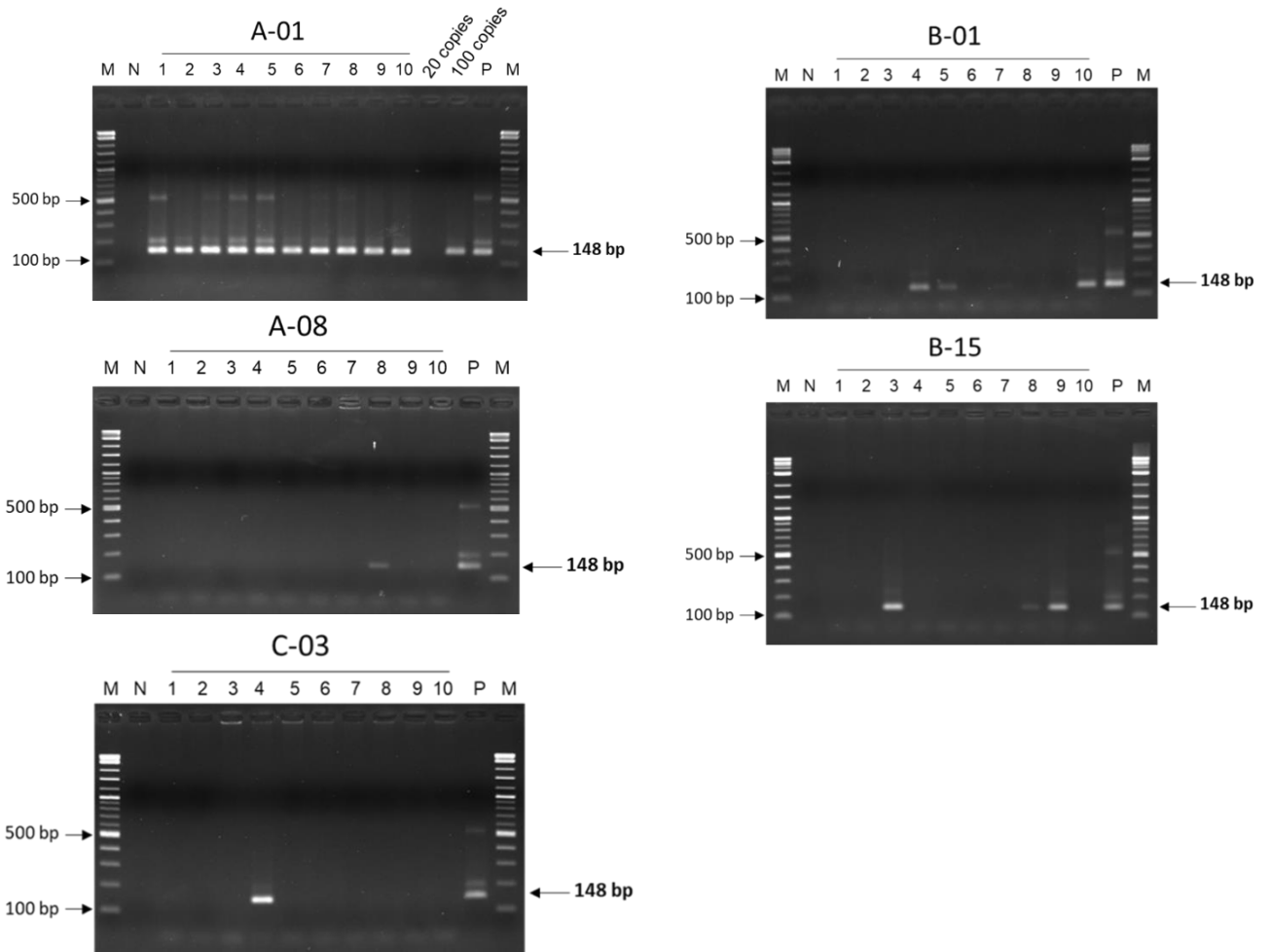
ภาพที่ 33 ผลการตรวจหาเชื้อ EHP โดยวิธี in situ hybridization เพื่อจำแนกกุ้งที่ด้านการติดเชื้อ EHP ได้ดี จากการสุ่มตัวอย่างกุ้งจำนวน 12 ตัว ณ เวลาต่างกันหลังทดสอบการติดเชื้อ (กุ้งหมายเลข 1E-6E เก็บตัวอย่างวันที่ 14 และกุ้งหมายเลข 7E-12E เก็บตัวอย่างวันที่ 16 หลังทดสอบการติดเชื้อ EHP) พบว่ามีกุ้งที่ติดเชื้อในปริมาณมากประมาณ 50% (หมายเลข 1E-3E และหมายเลข 7E-9E) ขณะที่ตัวอย่างอีกส่วนไม่มีพบสารพันธุกรรมของ EHP ในตับ หรือพบได้น้อยกว่า (หมายเลข 4E-6E และหมายเลข 10E-12E) การทดสอบนี้จะใช้ nucleotide probe สังเคราะห์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 18s ของเชื้อ EHP ผลบวกจากปฏิกิริยาการจับกันระหว่างสารพันธุกรรมจะแสดงเป็นจุดสีน้ำตาลดำ

3.4 งานวิจัยเพิ่มเติม (ตามคำแนะนำของกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ)

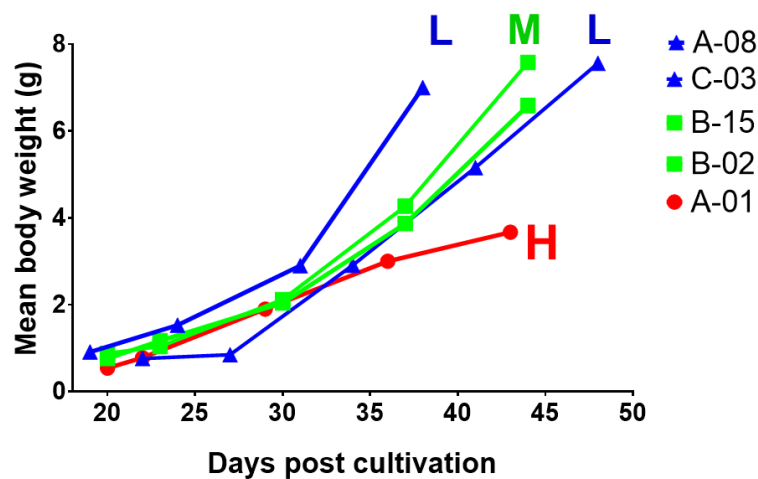
3.4.1 ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการติดเชื้อ EHP ในลูกกุ้งและการเจริญเติบโต

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์คือ ศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อ EHP ในกุ้งขาวและอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งที่เพาะเลี้ยงในบ่อ โดยผลการศึกษานี้ อาศัยการเก็บข้อมูลการตรวจการติดเชื้อ EHP ในลูกกุ้งเพาะเลี้ยงแต่ละบ่อร่วมกับการติดตามบันทึกอัตราการเจริญเติบโตในบ่อเลี้ยง โดยตัวอย่างกุ้งได้จากบ่อภาคเอกชนจำนวน 5 บ่อในพื้นที่เพาะเลี้ยงแหล่งเดียวกัน ผลการตรวจหาเชื้อ EHP ในลูกกุ้งที่อายุ 20 วัน โดยวิธี nested-PCR พบว่า อัตราการติดเชื้อต่างกันในแต่ละบ่อ ผลการสุ่มตรวจในตัวอย่างกุ้ง 10 ตัวอย่างพบลูกกุ้งที่ติดเชื้อมากที่สุด 1 บ่อ (A01) ผลตรวจ nested PCR ให้ผลบวกทั้ง 10 ตัว ส่วนตัวอย่างกุ้งอีก 4 บ่อติดเชื้อน้อยคือ 1 ใน 10 ตัวอย่าง พบ 2 บ่อ (A08 และ C03) อีก 2 บ่อพบผลบวก 3-4 ตัวใน 10 ตัว (ผล PCR แสดงในภาพที่ 34) จากผลการตรวจสามารถกำหนดอัตราการติดเชื้อในกุ้งที่เลี้ยงได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ติดเชื่อน้อย (1 ตัวใน 10 ตัวอย่าง, S), ติดเชื้อปานกลาง (3-4 ใน 10 ตัวอย่าง, M) และ ติดเชื้อมาก (ติดทั้งหมดใน 10 ตัวอย่าง, L)

จากข้อมูลการตรวจโรค เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตจะพบว่าเฉพาะกุ้งบ่อที่ติดเชื้อมาก หมายเลข A01 มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าบ่ออื่น ค่อนข้างชัดเจน โดยที่ระยะเวลาประมาณ 40 วัน น้ำหนักกุ้งเฉลี่ยจากบ่อ A01 จะอยู่ที่ประมาณไม่เกิน 4 กรัม ในขณะที่กุ้งอีก 4 บ่อ น้ำหนักกุ้งเฉลี่ยจะประมาณ 7-8 กรัม ข้อมูลน้ำหนักกุ้งเฉลี่ยสอดคล้องกับอัตราการโตต่อวันซึ่งจะพบว่ากุ้งในบ่อที่ติดเชื้อ EHP มากจะมีค่าอัตราการโตต่อวัน (ADG) น้อยกว่าตัวอย่างกุ้งในอีก 4 บ่อ (ภาพที่ 35) จากข้อมูลนี้จึงสันนิษฐานได้ว่า การติดเชื้อ EHP ในลูกกุ้งที่เพาะเลี้ยงมีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งในระหว่างการเลี้ยง อย่างไรก็ตามมีข้อที่น่าสังเกตคือ ในอีก 4 บ่อที่มีการติดเชื้อของลูกกุ้งบ้างแต่ไม่มากจะพบว่าอัตราการเจริญเติบโตอยู่ในเกณฑ์ใกล้เคียงกัน และอัตราการเติบโตยังคงเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพาะเลี้ยง ซึ่งจากข้อมูลนี้อาจจะสรุปได้ว่าอัตราการติดเชื้อ EHP ที่สูงน่าจะมีความสัมพันธ์กับการโตของกุ้ง ในขณะเดียวกันสิ่งที่น่าสงสัยว่า EHP มีผลกระทบต่ออัตราการโตของกุ้ง อาจจะต้องพิจารณาจากปริมาณของเชื้อที่พบในตัวอย่างที่ส่งตรวจ เพราะการตรวจพบเชื้อบ้างในตัวอย่างกุ้งอาจจะไม่ได้บ่งชี้ถึงผลกระทบต่ออัตราการเติบโตของกุ้งในบ่อโดยรวม แต่จะต้องอาศัยข้อมูลปริมาณของเชื้อเปรียบเทียบด้วย



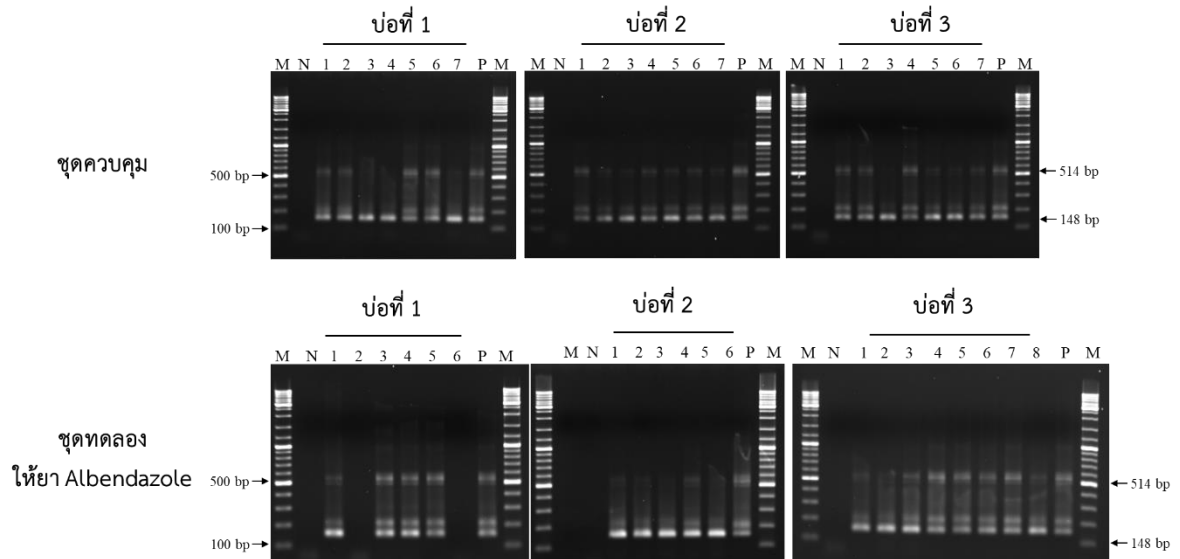
ภาพที่ 34 ผลการตรวจการติดเชื้อ EHP ในตัวอย่างลูกกุ้งจากตัวอย่างกุ้ง 5 บ่อโดยวิธี nested PCR ผลตรวจหาเชื้อ EHP ที่ให้ผลบวกจะพบผลิตภัณฑ์ PCR 2 ขนาดคือ 514 base pairs และ 148 base pairs



ภาพที่ 35 แผนภูมิแสดงผลบันทึกน้ำหนักกุ้งเฉลี่ยและอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งจากตัวอย่างกุ้ง 5 บ่อโดยอัตราการติดเชื้อในกุ้งที่เลี้ยงได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ติดเชื่อน้อย (1 ตัวใน 10 ตัวอย่าง, S), ติดเชื้อปานกลาง (3-4 ใน 10 ตัวอย่าง, M) และ ติดเชื้อมาก (ติดทั้งหมดใน 10 ตัวอย่าง, L)

3.4.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ EHP ด้วยยาต้านปรสิต Albendazole

การทดสอบยาปฏิชีวนะ Albendazole ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP โดยให้ยา 3 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้กิ้งกิ้งกินเป็นเวลา 30 วัน ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกิ้งกิ้งที่ได้รับอาหารที่ผสม albendazole และไม่ผสม ดังแสดงในภาพที่ 36



ภาพที่ 36 แสดงผลการติดเชื้อ EHP เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสม Albendazole และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสม ในการทดลองทำในกิ้ง 3 บ่อ โดยแยกเลี้ยงเป็น 2 ถัง ถึงที่ได้รับอาหารผสม และถึงที่ได้รับอาหารปกติ ทำการเลี้ยงกิ้งเป็นเวลา 30 วัน ทำการสุ่มกิ้ง 6-8 ตัวมาตรวจหาระดับเชื้อ EHP โดยวิธี SWP-PCR

บทที่ 4 ข้อวิจารณ์และบทสรุปผลการทดลอง

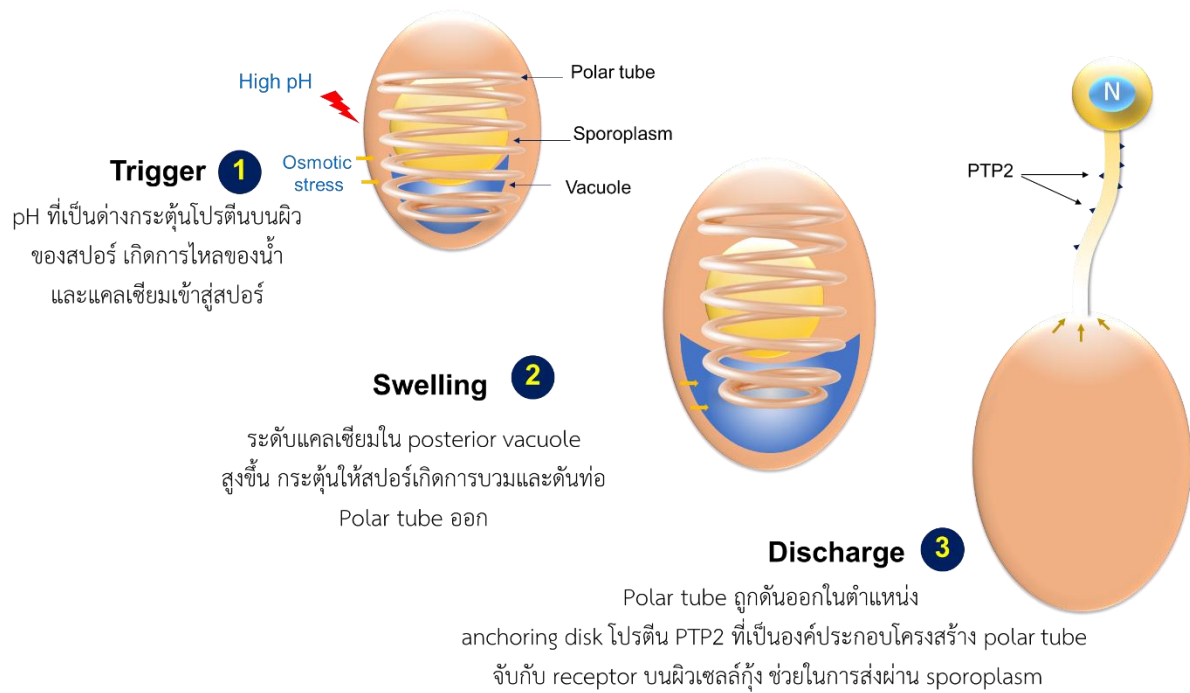
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างความรู้และความเข้าใจในการก่อโรค การแพร่กระจายของเชื้อ การงอกของสปอร์ของเชื้อ EHP ในตัวกุ้ง อันจะนำไปสู่การแก้ปัญหาการติดเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยง ผลงานวิจัยที่ได้มาก่อนหน้านี้พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ EHP เกิดขึ้นโดยการเลี้ยงกุ้งปลอดเชื้อ EHP ร่วมกับกุ้งติดเชื้อ EHP ในถังทดลอง (แต่ไม่มีการสัมผัสกันโดยตรง) ที่เรียกว่า Co-habitation assay ซึ่งทำให้กุ้งปลอดเชื้อในตอนแรกติดเชื้อ EHP ทั้งหมด (Salachan et al., 2017, Jaroenlak et al., 2016) จึงมีการตั้งสมมติฐานว่าสปอร์ของเชื้อ EHP ในซีกุ้งเป็นตัวกลางสำคัญในการแพร่กระจายของเชื้อ แต่ยังไม่ได้มีการทดลองยืนยันสมมติฐานนี้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบสปอร์ของเชื้อ EHP ในซีกุ้งโดยใช้เทคนิค wet smear พบสปอร์ของเชื้อจำนวนมากในซีกุ้งที่ติดเชื้อ EHP และสปอร์ที่พบมีความสามารถในการงอก แสดงให้เห็นว่าเป็นสปอร์ที่มีชีวิตและสามารถก่อโรคในกุ้งได้ เมื่อนำกุ้งติดเชื้อเหล่านี้มาเลี้ยงในถังทดลองเป็น 1 เดือนก่อนที่จะนำกุ้งเหล่านี้ออกจากถังทดลอง และนำกุ้งปลอดเชื้อ EHP ใส่ลงไป เพื่อทดลองว่ากุ้งที่ไม่ติดเชื้อเหล่านี้ ติดเชื้อจากน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งที่ติดเชื้อมาก่อนหรือไม่ ผลการทดลองพบว่าเริ่มพบการติดเชื้อในวันที่ 4 และติดเชื้อทั้งหมดในวันที่ 6 และมีความรุนแรงของการติดเชื้อเพิ่มขึ้นจนวันที่ 10 กุ้งทดลองทุกตัวติดเชื้อแบบ severe infection ทั้งหมด เมื่อนำน้ำมาตรวจดูปริมาณสปอร์ก็พบสปอร์ของเชื้อ EHP อยู่เป็นจำนวนมาก ผลงานวิจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สปอร์ของเชื้อ EHP เป็นตัวการสำคัญในการแพร่กระจายของโรคนี้ งานวิจัยที่ดำเนินการอยู่ในขณะนี้คือการศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อ EHP ที่อยู่ในน้ำจะมีชีวิตอยู่ได้นานเท่าใด โดยไม่มีกุ้งอยู่ ผลงานวิจัยที่ได้สามารถนำไปใช้กับบ่อเลี้ยงของเกษตรกรในกรณีที่บ่อเลี้ยงมีกุ้งติดเชื้อ EHP ในรอบการเลี้ยงก่อนหน้า

งานวิจัยต่อมาเป็นการศึกษาว่าการงอกของสปอร์ที่เรียกว่า polar tube extrusion (Aldama-Cano et al., 2018) เป็นกระบวนการสำคัญที่จะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในกุ้งได้หรือไม่ จึงได้มีการเตรียมสปอร์ของเชื้อ EHP ที่สามารถงอกได้ และ EHP ที่ไม่สามารถงอกได้โดยผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 60 วินาที หลังจากนั้นนำสปอร์ไปผสมอาหารกุ้งให้กุ้งกินเป็นเวลา 14 วัน ก่อนนำมาตรวจ PCR โดยใช้ EHP-SWP method ผลการศึกษาพบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมสปอร์ที่งอกได้ทั้งหมดติดเชื้อ EHP ในวันที่ 22 หลังการให้อาหาร ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสปอร์ที่ผ่านความร้อนที่ 75°C 60 วินาที ไม่พบกุ้งติดเชื้อเลย ผลการทดลองดังกล่าวยืนยันว่าการงอกของสปอร์เป็นกระบวนการสำคัญในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในตัวกุ้ง (Munkongwongsiri et al., submission) วิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบอาหารกุ้งสำเร็จรูปที่มีขายในท้องตลาดที่ตรวจพบว่ามีสปอร์ปนเปื้อนของเชื้อ EHP ด้วยวิธี PCR โดยอาหารชนิด CS1 และ CS2 ตรวจพบ EHP ปริมาณ $2.6 \pm 0.3 \times 10^7$ และ $5.6 \pm 0.2 \times 10^6$ copies/อาหาร 1 กรัมตามลำดับ เมื่อสอบถามไปยังบริษัทผู้ผลิตอาหาร พบว่าอาหารทั้งสองชนิดมีการผ่านความร้อนที่ $\geq 75^\circ\text{C}$ เป็นระยะเวลา มากกว่า 60 วินาที เมื่อนำอาหาร CS1 และ CS2 มาเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 22 วันและนำกุ้งมาตรวจ EHP โดยใช้ PCR พบว่าไม่พบการติดเชื้อในกุ้งที่ได้รับอาหาร CS1 และ CS2 ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารที่สปอร์สามารถงอกได้ ยังคงติดเชื้อทั้งหมด ผลการทำลองดังกล่าวบ่งชี้ว่า DNA ของเชื้อ EHP ที่พบในอาหารสำเร็จรูป CS1 และ CS2 เกิดจากเชื้อ EHP ที่ไม่มีชีวิต ไม่สามารถก่อโรคได้

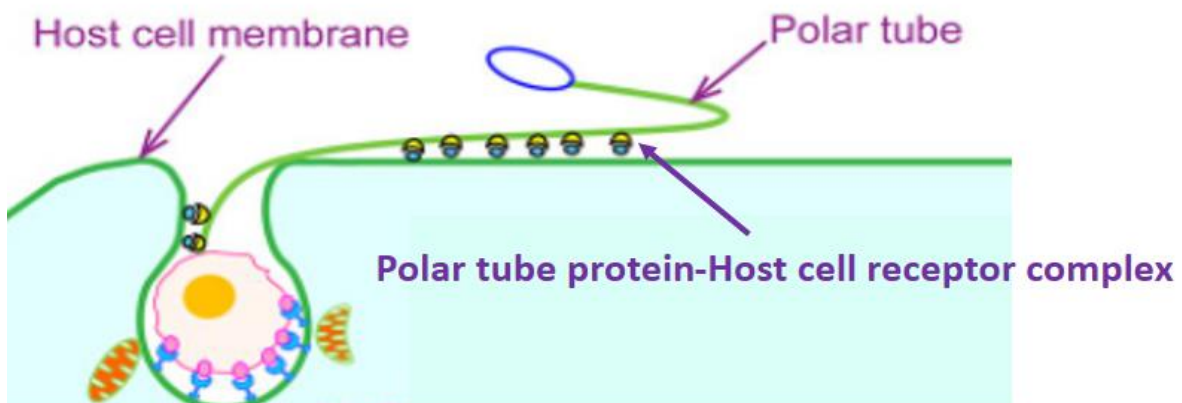
งานวิจัยต่อมาเป็นการสร้างองค์ความรู้ในกลไกการงอกของสปอร์และตัวกระตุ้นการงอกการหาตำแหน่งในทางเดินอาหารที่มีการงอกของสปอร์ต้องใช้เทคนิค Immunohistochemistry หรือ Immunofluorescence ในการตรวจหาโปรตีนที่อยู่บน polar tube โดยใช้ antibody งานวิจัยเพื่อหาโปรตีนบน polar tube พบโปรตีน PTP2 (Polar tube protein 2) ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 31 kDa และมีรายงานในไมโครสปอริเดียนชนิดอื่นว่าเป็นโปรตีนที่มีความหลากหลายมาก (Polonais et al., 2005) และเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการงอกของ polar tube เมื่อทดลองยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ โดยใช้ dsRNA-mediated RNAi พบว่ามีการลดปริมาณเชื้อ EHP ลงอย่างมีนัยสำคัญ บ่งชี้ว่าโปรตีน PTP2 มีความสำคัญต่อการก่อโรคของเชื้อ EHP เมื่อใช้เทคนิค Immunofluorescence พบว่าโปรตีน PTP2 กระจายอยู่บน Polar tube เมื่อนำ content ในกระเพาะอาหาร ตับ และลำไส้ของกิ้งก่าที่ติดเชื้อ EHP มาตรวจ ก็พบว่าตำแหน่งที่พบสปอร์ที่มีการงอกของ polar tube คือที่ตับและลำไส้ ไม่พบสปอร์ที่งอกในกระเพาะอาหาร (Taengchaiyaphum et al., manuscript in preparation) ซึ่งหมายถึงเมื่อสปอร์เข้าสู่ปากกิ้งจากการแพร่กระจายจากขี้กิ้งติดเชื้อลงมาในน้ำ สปอร์จะผ่านจากกระเพาะอาหารเข้าไปในตับ และการงอกของสปอร์เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ EHP จะเกิดขึ้นในตับ ซึ่งผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ว่าบริเวณ gastric sieve ที่กั้นระหว่างกระเพาะอาหารและตับมีขนาดของ pore size เท่ากับ $0.7 \mu\text{m}$ เท่านั้น (Pattarayingsakul et al., 2019) ในขณะที่ขนาดของสปอร์เท่ากับ $1-2 \mu\text{m}$ ซึ่งไม่สามารถผ่านจากกระเพาะเข้าไปที่ตับได้ ต้องมีการทำงานวิจัยเพิ่มเติมเพื่อทดสอบว่าสปอร์ของเชื้อ EHP เข้าสู่ตับได้อย่างไร

การนำ content ของตับมาแยกโปรตีนด้วยวิธี Ammonium sulfate precipitation และนำโปรตีนแต่ละส่วนที่ได้มาใช้ในการกระตุ้นการงอกของสปอร์ไม่ประสบผลสำเร็จ โดยไม่พบโปรตีนที่สามารถกระตุ้นการงอกได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อวัด pH ในตับเปรียบเทียบกับลำไส้และกระเพาะอาหารพบว่า pH ในตับ (7.07-8.09) และลำไส้ (7.32-8.2) มีความเป็นด่างสูงกว่า pH ในกระเพาะอาหาร (pH 6.53-7.14) จึงได้ทดลองผลกระทบของ pH ต่อการงอกของสปอร์ และพบว่า pH สูงทำให้สปอร์งอกได้มากกว่า pH ต่ำ โดย pH 8 สามารถกระตุ้นให้สปอร์งอกถึง 25.67% ในขณะที่ pH 7 มีการงอกของสปอร์เพียง 0.67% เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นให้สปอร์งอกเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มี pH สูง คือการมี Calcium ในระบบสูงขึ้น คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานการกระตุ้นการงอกของสปอร์ของเชื้อ EHP ดังแสดงในภาพที่ 37

แนวทางที่จะนำไปใช้ในการยับยั้งการงอกของสปอร์จากผลงานวิจัยที่ได้คือการหาแนวทางในการลด pH และปริมาณแคลเซียมในตับโดยการผสมตัวลด pH และแคลเซียมในอาหารกิ้งก่าที่ติดเชื้อ EHP ซึ่งต้องพิจารณาถึงผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกิ้งก่าด้วย การยับยั้งการทำงานของ PTP2 บน polar tube โดยพบว่าเมื่อมีการงอกของ polar tube โปรตีน PTP ของ polar tube จะต้องจับอย่างจำเพาะกับ receptor บนผิวเซลล์ของ Host ก่อนที่จะมีการส่งถ่าย sporoplasm จากสปอร์ไปยังเซลล์ของ Host (Han et al., 2019) เพื่อเพิ่มจำนวน ดังแสดงในภาพที่ 38



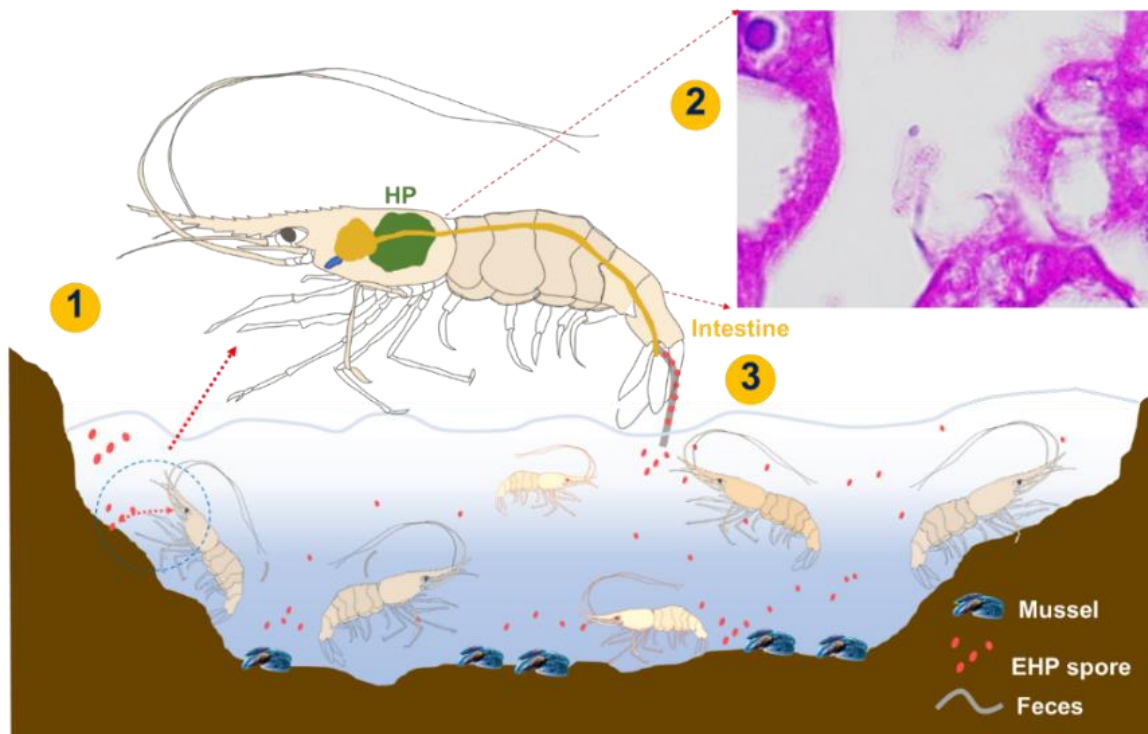
ภาพที่ 37 แสดงสมมติฐานการเกิดการงอกของสปอร์ของเชื้อ EHP ในตับกึ่ง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือการมี pH ที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการไหลของน้ำและแคลเซียมเข้าสู่สปอร์ ทำให้สปอร์บวมและกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ที่มีการสร้าง polar tube ที่มี PTP2 ออกมา



ภาพที่ 38 แสดงขั้นตอนการถ่ายทอดสารพันธุกรรมที่อยู่ใน sporoplasm ของเชื้อไมโครสปอริเดียน ภายหลังจากการงอกของ polar tube โดยโปรตีนที่อยู่บน polar tube จะจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ของ Host ก่อนที่จะทำการถ่ายยัย sporoplasm จากสปอร์ไปยัง host cell เพื่อเพิ่มจำนวนในเซลล์ (Han et al., 2019)

การขัดขวางการจับกันระหว่าง polar tube protein กับ Host receptor ทำให้สปอร์ไม่สามารถถ่ายทอด sporoplasm ได้ งานวิจัยนี้จึงได้สร้าง antibody ต่อ PTP2 เพื่อทดสอบว่าเชื้อ EHP ต้องสร้าง PTP-host receptor complex เหมือนไมโครสปอริเดียนชนิดอื่น และการขัดขวางการจับกันโดยใช้ antibody ต่อ PTP2 ทำให้การเพิ่มจำนวนของเชื้อลดลง ผลงานวิจัยพบว่า มีแนวโน้มการลดลงของเชื้อ EHP ในกุ้งที่ได้รับ antibody ต่อ PTP2 ซึ่งจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม ถึงปริมาณและความถี่ที่เหมาะสมต่อไป โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียม antibody จาก ไข่ไก่ที่เรียกว่า IgY-PTP2 ซึ่งจะมีราคาถูก ผลิตได้ในปริมาณมาก เพื่อนำมาใช้ในการผสมอาหารต่อไป

ระหว่างการทำงานวิจัย คณะผู้วิจัยพบว่าเกษตรกรลงลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อ EHP ในบ่อที่มีการเตรียมอย่างดีและไม่มีรายงานของการระบาดของเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยงมาก่อน คณะผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานถึงการมี Environmental reservoir(s) ในบ่อเลี้ยง ซึ่งต่อมาพบว่า หอยใน genus *Mytilopsis* และ *Perna* รวมถึงสัตว์ที่อยู่ในกลุ่ม Gastrotrix เป็น candidates จากการสำรวจโดยใช้ 18S rRNA sequencing ในงานวิจัยนี้ได้ทำงานวิจัยในหอยกะพง พบว่าหอยกะพงสามารถเก็บสะสมสปอร์ของเชื้อ EHP ใน digestive tract ได้ แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อ EHP ในเซลล์ของหอย (Mechanical carrier) ดังแสดงในภาพที่ 39 ดังนั้นจึงมีคำแนะนำแก่เกษตรกรในการจัดการกับหอยกะพงในระหว่างการเตรียมบ่อเลี้ยงและระหว่างการเลี้ยง



ภาพที่ 39 แสดงการแพร่กระจายของสปอร์ของเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยงที่เกิดจากสปอร์ที่อยู่ในขี้กุ้งที่ติดเชื้อหรือสะสมอยู่ในหอยกะพงที่มีชีวิตในบ่อ เมื่อหอยตายก็สามารถแพร่กระจายสปอร์ของเชื้อออกสู่น้ำและกุ้งที่เลี้ยงในบ่อต่อไป

แนวทางหนึ่งที่ใช้ในการตัดการกับโรคระบาดคือ การพัฒนาสายพันธุ์กึ่งที่ทนต่อการติดเชื้อก่อโรคนั้นๆ ระหว่างการทำ co-habitation assay ที่มีการเลี้ยงกึ่งปลอดเชื้อร่วมกับกึ่งที่ติดเชื้อ EHP คณะผู้วิจัยพบว่ากึ่งแต่ละตัวมีการติดเชื้อ EHP แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบกึ่งที่มีการติดเชื้อน้อยมากไปจนถึงมีการติดเชื้ออย่างหนักในทุก lot ของกึ่งที่ทดลอง จึงได้ทำการทดสอบหา microsatellite marker เพื่อตรวจดูว่าตัวที่มีการติดเชื้อน้อยในแต่ละ lot มี genetic marker เหมือนกันหรือไม่ การทดลองเบื้องต้นพบว่ากึ่งที่ติดเชื้อ EHP น้อยมี microsatellite marker ที่เหมือนกัน จึงได้ทำงานวิจัยร่วมกับภาคเอกชนให้มีการ mating พ่อแม่พันธุ์ให้มีลูกพันธุ์ตาม marker ที่ต้องการ ก่อนนำมาตรวจสอบความทนต่อการติดเชื้อ EHP ต่อไป

บทที่ 5 ข้อเสนอแนะ

การค้นพบ	ข้อเสนอแนะ
สปอร์ของเชื้อ EHP น่าจะเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อ EHP ในบ่อเลี้ยง	<ol style="list-style-type: none"> 1. ไม่ควรเลี้ยงกุ้งความหนาแน่นสูง 2. ควรเปลี่ยนถ่ายน้ำเมื่อมีการตรวจพบกุ้งเริ่มติดเชื้อ EHP เพื่อลดปริมาณสปอร์ในบ่อเลี้ยง 3. น้ำที่ปนเปื้อนด้วยสปอร์ของเชื้อ ควรมีการจัดการฆ่าเชื้อก่อนปล่อยน้ำสู่สิ่งแวดล้อม
สปอร์ของเชื้อ EHP จะไม่งอกในกระเพาะอาหาร แต่งอกในตับและลำไส้	<ol style="list-style-type: none"> 1. การพัฒนาแนวทางการลด pH และปริมาณแคลเซียมในระดับขณะเริ่มพบกุ้งติดเชื้อ EHP 2. การพัฒนาสารชีวภาพในการขัดขวางกับการจับกันของ polar tube protein กับเซลล์กุ้ง
อุณหภูมิที่ 75 °C สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้	<ol style="list-style-type: none"> 1. อาหารเม็ดสำเร็จรูปควรผ่านความร้อนอย่างน้อยที่ 75 °C ระหว่างขั้นตอนการผลิตเพื่อทำลายสปอร์ของเชื้อที่อาจปนเปื้อนมาในส่วนประกอบของอาหาร 2. อาหารสำเร็จรูปที่ผ่านความร้อน อาจตรวจพบผลบวก EHP ด้วยวิธี PCR ได้ แต่อาจเป็น EHP ที่ตายแล้ว
หอยสองฝาในกลุ่ม <i>Mytilopsis</i> เป็น Mechanical reservoir ของเชื้อ EHP ได้	<ol style="list-style-type: none"> 1. ควรมีการกำจัดหอยให้หมดระหว่างเตรียมบ่อก่อนการเลี้ยงกุ้งและระหว่างการเลี้ยง 2. ควรตรวจสอบท่อส่งน้ำเข้า-ออกในบ่อเลี้ยงว่าไม่มีหอยชนิดนี้เกาะอยู่และหมั่นทำความสะอาดอยู่เสมอ
การใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่ม Albendazole ไม่สามารถลดการติดเชื้อ EHP ในกุ้งได้	ไม่ควรใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้ในการรักษาหรือควบคุมเชื้อ EHP
กุ้งแต่ละตัวมีความต้านทานต่อการติดเชื้อ EHP ได้ไม่เท่ากัน	ควรมีการทดลองแนวทางพัฒนาสายพันธุ์กุ้งทนเชื้อ EHP ขึ้น

บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง

- Aldama-Cano, D.J., Sanguanrut, P., Munkongwongsiri, N., Ibarra-Gómez, J.C., Itsathitphaisarn, O., Vanichviriyakit, R., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., 2018. Bioassay for spore polar tube extrusion of shrimp *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). *Aquaculture* 490, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.039>
- Bodoy A., Garnier J., Heurtebise S., Nollet V., Chagot D. 1991. Diversification des productions conchylicoles en Poitou-Charentes: l'élevage du pétoncle noir *Chlamys varia*. Report No. RIDRV-91-11-RA/LA TREMBLADE. IFREMER, La Tremblade.
- Denise k., Garcia and Acacia alcivar-warren. 2007. Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. *Journal of shellfish research* 26(4), 1203-1216.
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P. M., Cali, A., Maier, K., Long, M., Levy, M., Tanowitz, H. B., Pan, G., Delbac, F., Zhou, Z. & Weiss, L. M. 2017. The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS Pathog*, 13, e1006341.
- Han B, Ma Y, Tu V, Tomita T, Mayoral J, Williams T, Horta A, Huang H, Weiss LM. 2019. Microsporidia interact with host cell mitochondria via voltage-dependent anion channels using sporoplasm surface protein 1. *mBio* 10: e01944-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01944-19>.
- Jaroenlak P, P. Sanguanrut, B.A.P. Williams, G.D. Stentiford, T.W. Flegel, K. Sritunyalucksana, O. Itsathitphaisarn. 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): e0166320.
- Jones J.B. 1981. A new microsporidium from the oyster *Ostrea lutaria* in New Zealand. *J Invertebr Pathol* 38:67–70.
- Li Z, Pan G, Li T, et al. SWP5, a spore wall protein, interacts with polar tube proteins in the parasitic microsporidian *Nosema bombycis*. *Eukaryot Cell*. 2012;11(2): 229-237. [doi:10.1128/EC.05127-11](https://doi.org/10.1128/EC.05127-11)

- Lohrmann K.B., Feist S.W., Brand A.R. 2000. Microsporidiosis in queen scallops (*Aequipecten opercularis* L.) from UK waters. *J Shellfish Res* 19:71–75.
- Pattarayingsakul, W.; Pudger, A.; Munkongwongsiri, N.; Vanichviriyakit, R.; Chaijarasphong, T.; Thitamadee, S.; Kruangkum, T. The gastric sieve of penaeid shrimp species is a sub-micrometer nutrient filter. *The Journal of Experimental Biology* 2019, 222, jeb199638, doi:10.1242/jeb.199638.
- Pie M.R., W.A. Boeger, L. Patella, R. M. Falleiros. 2006. A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *J Molluscan Stud.* 72(2): 218–219.
- Polonais, V.; Prensier, G.; Méténier, G.; Vivarès, C.P.; Delbac, F. Microsporidian polar tube proteins: Highly divergent but closely linked genes encode PTP1 and PTP2 in members of the evolutionarily distant *Antonospora* and *Encephalitozoon* groups. *Fungal Genetics and Biology* 2005, 42, 791–803, doi:https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.05.005
- Polonais, V.; Belkorchia, A.; Roussel, M.; Peyretailade, E.; Peyret, P.; Diogon, M.; Delbac, F. Identification of two new polar tube proteins related to polar tube protein 2 in the microsporidian *Antonospora locustae*. *FEMS Microbiology Letters* 2013, 346, 36–44, doi:10.1111/1574-6968.12198.
- Sanguanrut, P., Munkongwongsiri, N., Kongkumnerd, J., Thawonsuwan, J., Thitamadee, S., Boonyawiwat, V., Tanasomwang, V., Flegel, T. W. & Sritunyalucksana, K. 2018. A cohort study of 196 Thai shrimp ponds reveals a complex etiology for early mortality syndrome (EMS). *Aquaculture*, 493, 26–36.
- Villalba A., Carballal M.J., López M.C. 1993a. Pathologic conditions of three carpet shell clam species of Galicia (NW of Spain). *Spec Publ Eur Aquacult Soc* 19:85
- Villalba A., López M.C., Carballal M.J. 1993b. Parasitos y alteraciones patologicas de tres especies de almeja, *Ruditapes decussatus*, *Venerupis pullastra*, y *Venerupis rhomboides*, en las rias gallegas. In: Cervino A, Landin A, de Coa A, Guerra A, Torre M (eds) *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*. Centro de Investigaciones Marinas, Pontevedra, p 551–556.
- Undeen, A. H. 1990. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *Journal of Theoretical Biology*, 142, 223–235.
- Williams B. A. 2009. Unique physiology of host–parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular Microbiology*, 11, 1551–1560.

- Wiredu Boakye D, Jaroenlak P, Prachumwat A, Williams TA, Bateman KS, Itsathitphaisarn O, et al. 2017. Decay of the glycolytic pathway and adaptation to intranuclear parasitism within Enterocytozoonidae microsporidia. *Environ Microbiol.* 19:2077–2089.
- Xu, Y. & Weiss, L. M. 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int J Parasitol*, 35, 941-953.
- Yang, D., Pan, L., Peng, P., Dang, X., Li, C., Li, T., Long, M., Chen, J., Wu, Y., Du, H., Luo, B., Song, Y., Tian, R., Luo, J., Zhou, Z. & Pan, G. 2017. Interaction between SWP9 and Polar Tube Proteins of the Microsporidian *Nosema bombycis* and Function of SWP9 as a Scaffolding Protein Contribute to Polar Tube Tethering to the Spore Wall. *Infect Immun*, 85.