

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกราม
ที่ติดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus และ Extra Small Virus

Histopathological Changes of *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and
Extra Small Virus infection in Broodstock of Giant Freshwater Prawn
(*Macrobrachium rosenbergii* De Man)

ศุภมาส ศรีวงศ์พุก

Supamas Sriwongpuk

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ถ.จิระ อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

Department of Agricultural Technology, Buri ram Rajabhat University, Buriram. 31000

บทคัดย่อ

กุ้งก้ามกรามถือว่าเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปัจจุบันอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยประสบปัญหาการระบาดของโรคเนื่องจากการติดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) และ Extra Small Virus (XSV) ในพ่อแม่พันธุ์ ทำให้เกิดการตายของกุ้งครั้งละจำนวนมากถึง 50-80 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลาอันรวดเร็ว จากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในกุ้งที่ป่วย พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มีขนาดเล็กลง (atrophy) ปริมาณเม็ดไขมันมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับในกุ้งปกติ พบ inclusion bodies ลักษณะเหมือนกับ Cowdry type A จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบ pyknotic nuclei หรือมีนิวเคลียสของเซลล์ที่แตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ (karyorrhexis) และพบ haemocyte จำนวนมากแทรกตัวอยู่ในบริเวณที่เกิดการตายของเซลล์ (necrotic cells) บริเวณตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อหัวใจ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และที่เส้นประสาท

คำสำคัญ: พยาธิสภาพเนื้อเยื่อ, พ่อแม่พันธุ์, กุ้งก้ามกราม, *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus, Extra Small Virus

Abstract

The giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), is important commercial aquatic species of Thailand. Now this industry has been affected by viral diseases, caused by *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) and Extra Small Virus (XSV). The mortality of diseased broodstock can reach 50-80% within a few days. Virus infection in broodstock showed many characteristics of histopathological changes namely minimal lipid, atrophy and inclusion bodies (Cowdry type A) in hepatopancreas. In addition pyknotic nuclei or karyorrhexis and haemocyte infiltration were found in hepatopancreas, cardiac muscle, connective tissue and nerve cord.

Key Words: Histopathological Change, Giant Freshwater Prawn, Broodstock, MrNV, XSV, Broodstock

คำนำ

กึ่งก้ามกรามเป็นกึ่งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยเฉพาะกึ่งเพศผู้ เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ (New, 1998) มีการเลี้ยงกันมากในภาคกลาง บริเวณจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม และราชบุรี ปัจจุบันนี้การเลี้ยงกึ่งก้ามกรามในประเทศไทยเป็นการเลี้ยงแบบกึ่งพัฒนา แต่มีการปล่อยลูกกึ่งอย่างหนาแน่น ทำให้ได้ผลผลิตต่ำ กึ่งบางส่วนป่วยเป็นโรค และโตช้า ตั้งแต่ปี 2523 ซึ่งถือว่าเป็นปีเริ่มต้นของการดำเนินการส่งเสริมและขยายการเพาะเลี้ยงกึ่งของกรมประมง (ธีรพันธุ์, 2523) และจากนั้นเป็นต้นมาก็ได้มีการปรับปรุงแก้ไขและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงกึ่งก้ามกรามให้เจริญก้าวหน้ามากขึ้นเป็นลำดับ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกึ่งก้ามกรามของประเทศไทยประสบปัญหาการระบาดของโรค ซึ่งทำให้เกิดการตายของกึ่งครั้งละจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็วโดยเฉพาะในลูกกึ่งก้ามกรามวัยอ่อน ซึ่งพบว่ามีการระบาดของโรคในหลายประเทศ เช่น ใน Guadeloupe, French West Indies (Arcier *et al.* 1999) ในไต้หวัน (Tung *et al.* 1999) จีน (Qian *et al.* 2003 และ Sri Widada *et al.* 2003) ในอินเดีย (Sahul Hameed *et al.* 2004) และในประเทศไทย (Yoganandhan *et al.* 2006) ลูกกึ่งที่ป่วยจะมีอาการกล้ามเนื้อเป็นสีขาวยุ่น โดยเฉพาะกล้ามเนื้อบริเวณส่วนท้อง จึงมักเรียกชื่อโรคนี้ตามอาการที่พบว่าโรคกล้ามเนื้อสีขาว (White Muscle Disease หรือ WMD) ซึ่งพบว่าสาเหตุของโรคเกิดจากไวรัส 2 ชนิด คือ *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) และ Extra Small Virus (XSV) (Sri Widada *et al.* 2003)

โรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการอนุบาลลูกกึ่งก้ามกรามเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการพัฒนาและขยายธุรกิจการเพาะเลี้ยงกึ่งก้ามกรามอย่างมาก จากปัญหาเรื่องโรคดังกล่าวข้างต้นทำให้ขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กึ่งก้ามกราม ทำให้ไม่สามารถเพาะฟักลูกกึ่งก้ามกรามออกสู่ตลาดได้อย่างเพียงพอกับจำนวนที่เกษตรกรต้องการได้นอกจากนั้นการวินิจฉัยโรคกึ่งก้ามกรามจากเชื้อไวรัส 2 ชนิดข้างต้นยังไม่ทราบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของกึ่งที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัสดังกล่าว ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์กึ่งก้ามกรามได้ เพื่อที่จะนำผลการศึกษาไปใช้ตัดสินใจในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์แข็งแรง และปลอดเชื้อมาทำการเพาะเลี้ยงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์กึ่งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัส MrNV และ XSV ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์สาเหตุของเชื้อโดยวิธี RT-PCR ตามวิธีการของ Sahul Hameed *et al.* 2004. จากฟาร์มเพาะเลี้ยงกึ่งก้ามกรามในจังหวัดสุพรรณบุรี ไปดองในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Bell and Lightner (1988) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงต่อไป

ผลและวิจารณ์ผล

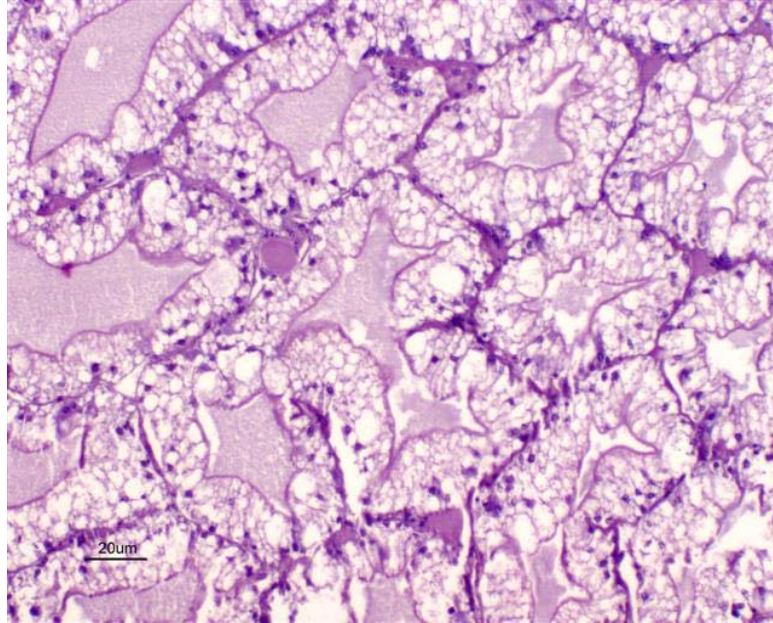
จากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในพ่อแม่พันธุ์กึ่งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัสชนิด MrNV และ XSV มีลักษณะตัวสีส้มเข้มกว่าปกติ (ภาพที่ 1) กึ่งมักจะไม่ค่อยเคลื่อนไหวโดยจะลอย

หิวอยู่ตามขอบบ่อ และจะตายในที่สุด เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของอวัยวะภายในต่าง ๆ ของกุ้งเหล่านี้ พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มีขนาดเล็กลง (atrophy) ปริมาณเม็ดไขมันมีอยู่น้อยเมื่อเทียบกับในกุ้งปกติ (ภาพที่ 2) พบ inclusion bodies ติดสีชมพูอมม่วงอยู่ในนิวเคลียส (basophilic intranuclear inclusion) (ภาพที่ 3) และ inclusion bodies ติดสีชมพูอมม่วงอยู่ในนิวเคลียส (acidophilic intranuclear inclusion) (ภาพที่ 4) จำนวนมาก ซึ่งลักษณะของ inclusion bodies ที่พบมีลักษณะเหมือนกับ Cowdry type A (inclusion) คือจะมีช่องว่างใสโดยรอบ inclusion ซึ่งอยู่ในส่วนของนิวเคลียส โดยเนื้อเยื่อในส่วนของตับและตับอ่อน จะพบการเปลี่ยนแปลงมากกว่าเนื้อเยื่อในส่วนอื่น ๆ และมีลักษณะที่แตกต่างจาก inclusion bodies จากการติดเชื้อจากไวรัสชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบการตายของเซลล์ (necrosis cells) บริเวณอื่น ๆ อีกด้วย ซึ่งจะมี pyknotic nuclei (ภาพที่ 5) ลักษณะเป็นเซลล์ทรงกลมย้อมติดสีน้ำเงินเข้มของฮีมาทอกไซลิน ขนาดเล็กกว่าเซลล์ปกติ หรือนิวเคลียสของเซลล์ที่แตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ (karyorrhexis) (ภาพที่ 6) และยังพบ haemocyte จำนวนมากแทรกตัวอยู่บริเวณที่เกิดการตายของเซลล์บริเวณกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) (ภาพที่ 7) กล้ามเนื้อหัวใจ (ภาพที่ 8) และที่บริเวณเส้นประสาท (ภาพที่ 9) อีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบริเวณนั้นเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ

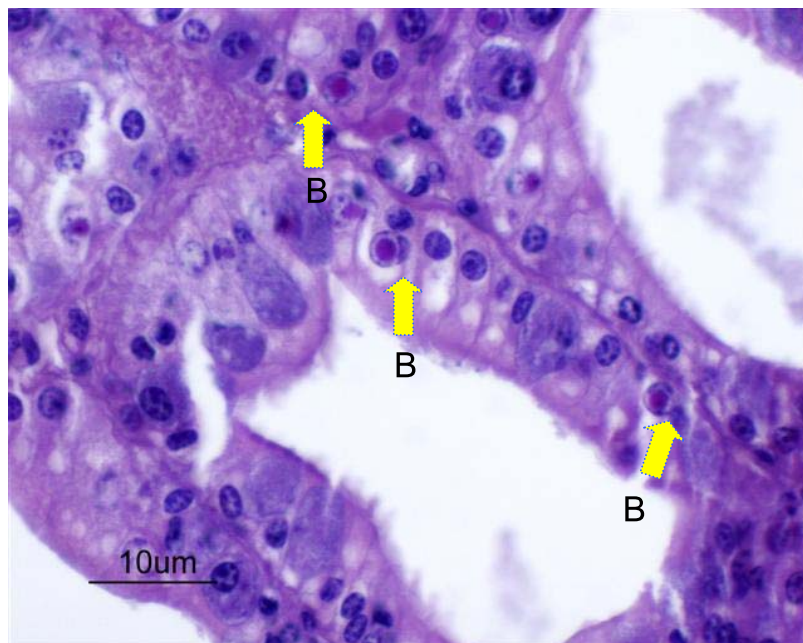
จากการศึกษาของ Yoganandhan *et al.* 2005 พบไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ในกล้ามเนื้อ น้ำเลือด และส่วนระยางค์ของกุ้งที่ป่วย แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบ inclusion bodies จำนวนมากในส่วนของเนื้อเยื่อตับ และตับอ่อน ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่ชัดเจนที่สุด เป็นลักษณะที่บ่งชี้ว่าการติดเชื้อนั้นมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส ดังนั้นวิธีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามวิธีนี้ จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการช่วยประกอบการตรวจวินิจฉัยโรคได้



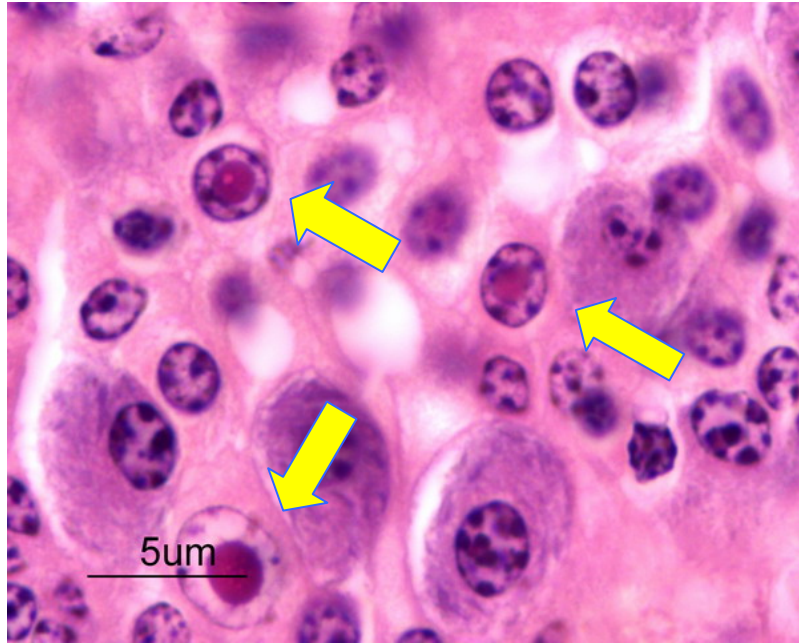
ภาพที่ 1 แม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัส MrNV และ XSV ตัวมีสีส้มเข้ม



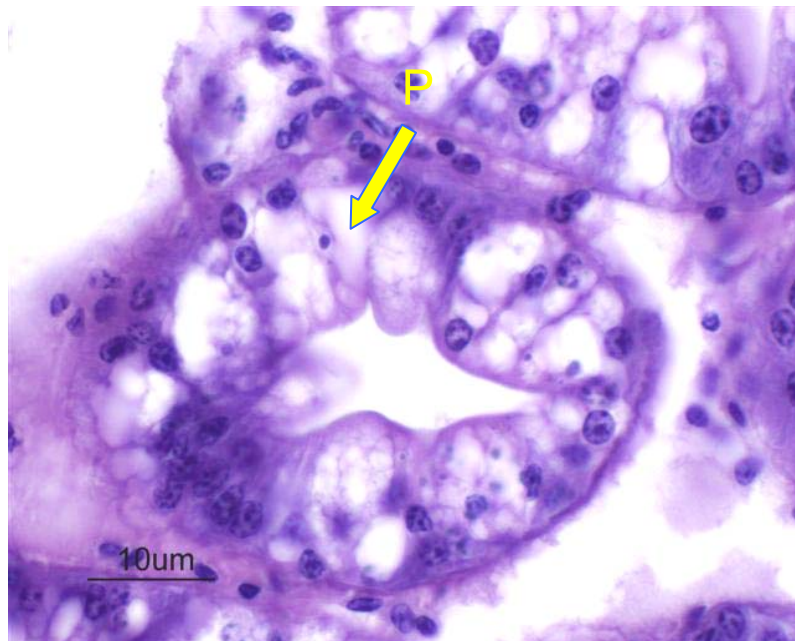
ภาพที่ 2 ตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคมที่ปกติจะมีเม็ดไขมันแทรกอยู่จำนวนมาก (H&E ; bar = 20 μ m)



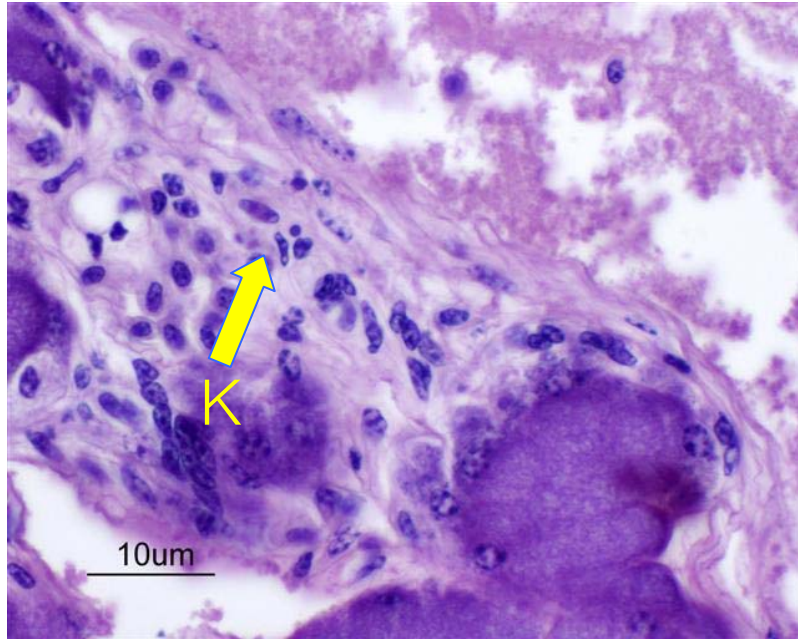
ภาพที่ 3 ลักษณะของ basophilic intranuclear inclusion (B) ลักษณะคล้าย Cowdry type A ที่พบในตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคมพ่อพันธุ์ที่ป่วย (H&E; bar = 10 μ m)



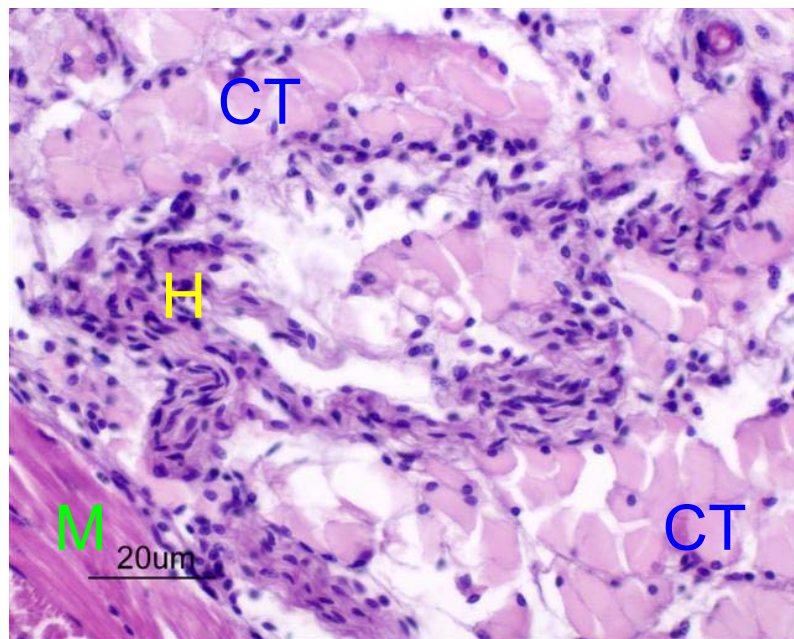
ภาพที่ 4 ลักษณะของ acidophilic intranuclear inclusion (ครซี) ลักษณะคล้าย Cowdry type A ที่พบในตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกราคมพ่อแม่พันธุ์ที่ป่วย (H&E; bar = 5 μm)



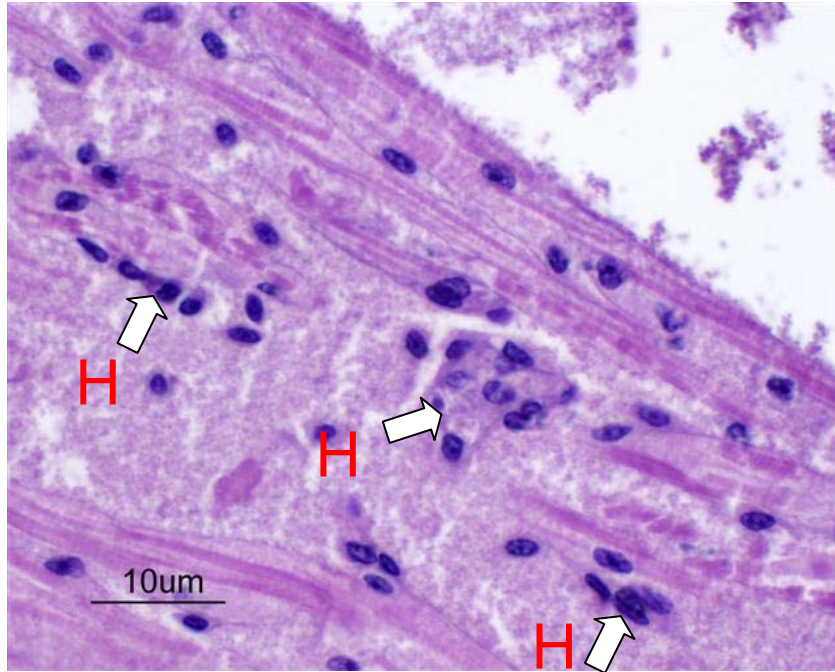
ภาพที่ 5 ลักษณะของ pyknotic nuclei (P) ที่พบบริเวณเซลล์นิวเคลียสที่ตายของกิ้งก่ามกราคมที่ป่วย (H&E; bar = 10 μm)



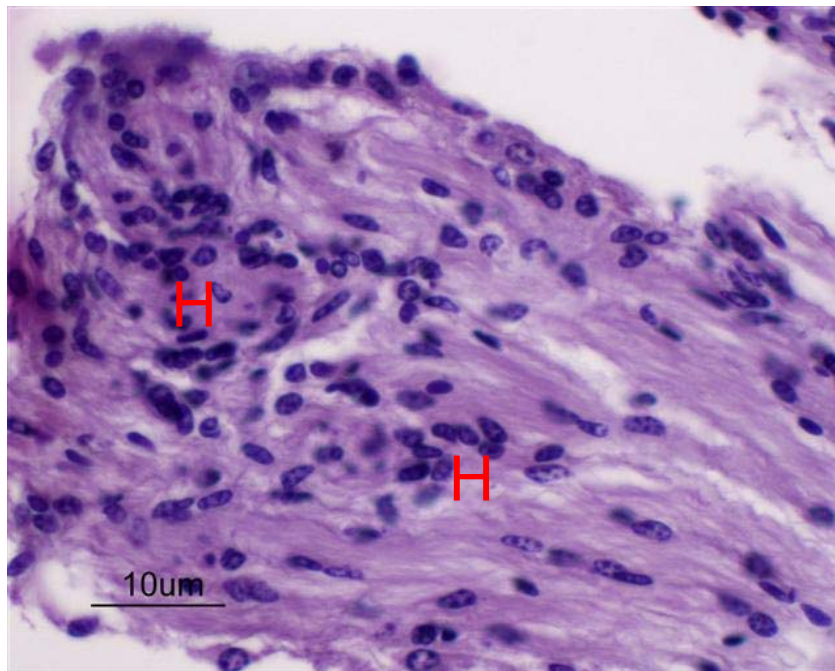
ภาพที่ 6 ลักษณะของ karyorrhexis (K) ที่พบบริเวณเซลล์เส้นประสาทที่เกิดการตายของ กุ้งก้ามกรามที่ป่วย (H&E; bar = 10 μm)



ภาพที่ 7 haemocyte (H) จำนวนมากแทรกตัวอยู่บริเวณที่เกิดการตายของเซลล์บริเวณกล้ามเนื้อ (M) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (CT) (H&E; bar = 20 μm)



ภาพที่ 8 haemocyte (H) จำนวนมากแทรกตัวอยู่บริเวณที่เกิดการตายของเซลล์บริเวณกลีมาเนื้อหัวใจ (H&E; bar = 10 μm)



ภาพที่ 9 haemocyte (H) จำนวนมากแทรกตัวอยู่บริเวณที่เกิดการตายของเซลล์เส้นประสาท (H&E; bar = 10 μm)

สรุปผล

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) และ Extra Small Virus (XSV) พบ inclusion bodies ที่มีลักษณะคล้าย Cowdry type A ในส่วนของตับและตับอ่อนจำนวนมากตามความรุนแรงของโรค ซึ่งถือเป็นอวัยวะที่มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนที่สุด ซึ่งลักษณะของ inclusion bodies จากการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวมีความแตกต่างจากของไวรัสชนิดอื่น สามารถนำลักษณะของ inclusion bodies มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยสาเหตุการติดเชื้อไวรัสในกุ้งก้ามกรามได้ และพบการตายของเซลล์ซึ่งจะพบ pyknotic nuclei, karyorrhexis หรือมี haemocyte แทรกอยู่บริเวณนั้น ๆ เช่น ที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กล้ามเนื้อมัดเล็ก ๆ บริเวณหัวใจหรือระยะงาค์ ตับและตับอ่อน และบริเวณเส้นประสาท

เอกสารอ้างอิง

- ธีรพันธุ์ ภูคาสุวรรณค์. 2523. บทบรรณาธิการกุ้งก้ามกราม. วารสารการประมง 33 (5): 511-518.
- Arcier, J.M., F. Herman, D.V. Lightner, R.M. Redman, J. Mari and J.R. Bonami. 1999. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Dis. Aquat. Org. 38: 177-181.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- New, M.B. 1998. The farm of *Macrobrachium rosenbergii* with special reference to South East Asia in aquaculture research and sustainable development in inland and coastal regions in South-East Asia , pp. 127-144. In M. Beveridge, R. Fuchs, J. Furberg, N. Kantsky, A. Reilly and P. Sorgeloos, eds. International Foundation for Science. Stockholm.
- Qian, D., Z. Shi., S. Zhang., Z. Cao., W. Liu., L. Li, Y. Xie, I. Cambournac and J.R. Bonami. 2003. Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Fish Dis. 26: 521-527.
- Sahaul Hameed, A.S., K. Yokanandhan, J. Sri Widada and J.R. Bonami. 2004. Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus like-particle (XSV) associated with white tail disease (WTD) of *Macrobrachium rosenbergii* in India by RT-PCR detection. Aquaculture 238: 127-133.

- Sri Widada, J., S. Durand, I. Cambournac, D. Qian, Z. Shi, E. Dejonghe, V. Richard and J.R. Bonami. 2003. Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. J. Fish Dis. 26: 583-590.
- Tung, C.W., C.S. Wang. and S.N. Chen. 1999. Histological and electron microscopic study on *Macrobrachium rosenbergii* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), culture in Taiwan. J. Fish Dis. 22: 319-323.
- Yokanandhan, K., J. Sri Widada, J.R. Bonami and A.S. Sahameed. 2005. Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. J. Fish Dis. 28: 65-69.
- Yokanandhan, K., M. Leartvibhas, S. Sriwongpuk and C. Limsuwan. 2006. White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rasenbergii* in Thailand. J. Aquatic. Org. 69: 255-258.