

การสำรวจการพบเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) จังหวัดนครศรีธรรมราชและพื้นที่ใกล้เคียง

สาวิตรี ฤทธิช่วย¹ ชลธิชา หนูเกตุ² ชลิตา เรทมิฬ³
พิชญ์สินี เรืองนาค⁴ สิริลักษณ์ สินธุพาชี⁵

บทคัดย่อ

กุ้งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีมูลค่าและปริมาณการผลิตสูงของประเทศไทย การจัดการสุขภาพและการจัดการฟาร์มที่ดีเป็นสิ่งจำเป็นในการเพิ่มผลผลิตและลดความเสียหายจากการเกิดโรค นอกจากนี้ การสำรวจการแพร่กระจายของโรคยังเป็นแนวทางสำคัญในการวางแผนเฝ้าระวังและควบคุมการระบาด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการพบเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) ด้วยเทคนิค PCR เพื่อเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรคกุ้งในจังหวัดนครศรีธรรมราชและพื้นที่ใกล้เคียง เนื่องจาก EHP ส่งผลกระทบต่อการผลิตกุ้ง โดยทำให้กุ้งโตช้า ขนาดไม่สม่ำเสมอและเพิ่มต้นทุนการผลิต

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งจากฟาร์ม (7 จุด) และตลาด (8 จุด) รวม 15 จุด จุดละ 5 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค PCR พบการติดเชื้อจำนวน 10 จุด คิดเป็นร้อยละ 66.7 โดยตรวจพบเชื้อทั้งในตัวอย่างจากฟาร์มเพาะเลี้ยงและตลาดค้าของสด ซึ่งมีแหล่งที่มาทั้งจากฟาร์มและแหล่งธรรมชาติ สะท้อนให้เห็นถึงการกระจายตัวของเชื้อ EHP ทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการใช้ไพรเมอร์มากกว่าหนึ่งชุดช่วยเพิ่มความไวและความน่าเชื่อถือในการตรวจหาเชื้อ ขณะที่ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นในการศึกษานี้มีความสามารถในการตรวจพบเชื้อต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไพรเมอร์จากงานวิจัยอ้างอิง ซึ่งอาจเป็นเพราะความแตกต่างของเทคนิคการตรวจและตำแหน่งของยีนเป้าหมาย ดังนั้นการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อ EHP และการเลือกใช้วิธีการตรวจที่เหมาะสม รวมถึงการจัดการฟาร์มที่ดีจะช่วยลดความเสี่ยงและป้องกันความเสียหายทางเศรษฐกิจและสังคมที่อาจเกิดขึ้นได้

คำสำคัญ: กุ้งขาว, การตรวจหาเชื้อ, การเฝ้าระวังโรค

¹ ดร. สังกัด คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

อีเมล: Savitree_rit@nstru.ac.th

² ปริญญาตรี สังกัด คณะคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

อีเมล: cholthicha0937907102@gmail.com

³ นักศึกษาปริญญาตรี สังกัด คณะคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

อีเมล: 6511402309@nstru.ac.th

⁴ นักศึกษาปริญญาตรี สังกัด คณะคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

อีเมล: 6511402309@nstru.ac.th

⁵ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สังกัด คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

อีเมล: siriluk_sin@nstru.ac.th

Survey of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Nakhon Si Thammarat Province and Adjacent Areas

Savitree Ritchuay¹ Cholthicha Nooket²

Chalita Rethamit³ Pitsinee Reangnak⁴ Siriluk Sintupachee⁵

Abstract

Shrimp are an economically important species in Thailand, with high production value and volume. Effective health and farm management are essential for increasing productivity and reducing losses caused by disease. In addition, surveillance of disease distribution is a key approach for planning, monitoring, and controlling outbreaks. This study aimed to investigate the occurrence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) using PCR techniques for disease surveillance in Nakhon Si Thammarat and nearby areas. EHP negatively impacts shrimp production by causing slow growth, size variation, and increased production costs.

A total of 15 sampling sites were included, comprising shrimp collected from farms (7 sites) and fresh markets (8 sites), with five samples per site. PCR detection revealed EHP infection in 10 sites (66.7%). Positive samples were found in both farmed shrimp and those obtained from fresh markets, which originated from both aquaculture systems and natural sources. These findings indicate a widespread distribution of EHP across both farming systems and the surrounding environment. The results suggest that the use of multiple primer sets improves the sensitivity and reliability of EHP detection. In contrast, the newly designed primers in this study showed lower detection efficiency compared to previously published primers, which may be attributed to differences in detection techniques and target gene regions. Therefore, continuous surveillance of EHP, the selection of appropriate detection methods, and proper farm management practices are important to reduce risks and mitigate potential economic and societal impacts.

Keywords: *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*), PCR, pathogen detection, Disease surveillance

¹ Ph.D., Faculty of Science and technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University
e-mail: savitree_rit@nstru.ac.th

² Bachelor's degree, Faculty of Science and technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University
e-mail: cholthicha0937907102@gmail.com

³ Bachelor's degree student, Faculty of Science and technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University
e-mail: 6511402309@nstru.ac.th

⁴ Bachelor's degree student, Faculty of Science and technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University
e-mail: 6511402306@nstru.ac.th

⁵ Asst. Prof. Dr., Faculty of Science and technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University
e-mail: siriluk_sin@nstru.ac.th

บทนำ

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทยและโลก โดยไทยมีมูลค่าการส่งออกในปี 2566 มากกว่า 2.5 หมื่นล้านบาท และสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรกว่า 200,000 ครัวเรือนทั่วประเทศ (กรมประมง, 2567) จากความต้องการกุ้งขาวในตลาดที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้มีเกษตรกรมีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในระบบที่มีความหนาแน่นสูงเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคต่างๆ ที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อผลผลิต โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงในระบบที่มีความหนาแน่นสูงจะเพิ่มความหนาแน่นของประชากรสัตว์ในแหล่งเลี้ยง ลดความหลากหลายทางพันธุกรรมและเกิดสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการแพร่กระจายของเชื้อโรค (Stentiford et al., 2012) โดยเชื้อก่อโรคที่สำคัญในกุ้งขาว ได้แก่ White Spot Syndrome Virus (WSSV) ก่อให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว, *Vibrio parahaemolyticus* ก่อให้เกิดโรค Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) และ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) ก่อให้เกิดโรค Hepatopancreatic Microsporidiosis (HPM) ทำให้กุ้งโตช้าและมีอาการอุจจาระเป็นสีขาว ซึ่งแต่ละโรคมีรูปแบบการแพร่ระบาดและผลกระทบที่แตกต่างกัน โดย EHP ถือเป็นเชื้อโรคเกิดใหม่ที่ก่อให้เกิดปัญหาอย่างต่อเนื่องในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลก

Enterocytozoon hepatopenaei เป็นเชื้อไมโครสปอริเดียนที่ถูกค้นพบครั้งแรกในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในประเทศไทยเมื่อปี 2552 โดย Tourtip et al. (2009) เชื้อนี้ก่อให้เกิดโรค Hepatopancreatic Microsporidiosis (HPM) และเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคซีขาว ผ่านการเข้าไปติดเชื้อในเซลล์ตับ (hepatopancreas) ของกุ้งทำให้เกิดการอักเสบมีการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อและรบกวนการทำงานของระบบย่อยอาหาร (Tang et al., 2015) การแพร่ระบาดของ EHP เกิดขึ้นได้ทั้งแบบแนวนอน (horizontal transmission) คือผ่านสภาพแวดล้อม ได้แก่ น้ำตะกอน และการกินซากกันเอง และแบบแนวตั้ง (vertical transmission) คือ จากแม่กุ้งสู่ลูกกุ้ง (Tangprasittipap et al., 2013)

ปัจจุบันมีรายงานพบการติดเชื้อ EHP ในหลายประเทศผู้ผลิตกุ้ง โดยประเทศไทยพบการระบาดครั้งแรกในปี พ.ศ. 2552 และมีความชุกของการติดเชื้ออยู่ในช่วงประมาณ 15-60% ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตลดลงประมาณ 20-40% และก่อให้เกิดความเสียหายทางธุรกิจอย่างมีนัยสำคัญ (Geetha et al., 2022) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบการติดเชื้อ EHP ในประเทศจีน เวียดนาม มาเลเซีย (Tran et al., 2025) และอินเดีย (Kumar et al., 2024) โดยมีความชุกอยู่ในช่วงประมาณ 10.6-96.6% ส่งผลให้ผลผลิตลดลงประมาณ 15-50% และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมและรูปแบบการเลี้ยงของแต่ละพื้นที่ ในส่วนผลกระทบทางด้านสังคมที่จะเกิดขึ้นจากการระบาดของ EHP นั้นอาจส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาชีพของเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะเกษตรกรรายย่อยที่มีทรัพยากรจำกัดในการจัดการและป้องกันโรค นอกจากนี้การลดลงของผลผลิตและคุณภาพกุ้งยังส่งผลกระทบต่อห่วงโซ่อุปทานและการจ้างงานในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการแข่งขันในตลาดส่งออก ซึ่งการสำรวจข้อมูลที่เป็นระบบและครอบคลุมพื้นที่จะทำให้การวางแผนป้องกันและควบคุมโรคมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ในประเทศไทยการระบาดของ EHP มีความรุนแรงระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับโรคอื่นๆ โดยไม่ทำให้เกิดอัตราการตายสูงโดยตรง แต่ส่งผลให้กุ้งเติบโตช้าและมีความแปรผันของขนาดผลผลิตในบ่อสูง (Chayaburakul et al., 2004) การสำรวจในพื้นที่ต่างๆ พบว่า EHP มีการแพร่กระจายในหลายจังหวัดที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้งแบบหนาแน่นสูง โดยเฉพาะในภาคตะวันออก (จันทบุรี ตราด) ภาคใต้ (สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา) และภาคกลาง (เพชรบุรี สมุทรสงคราม) ความรุนแรงของการติดเชื้อจะแตกต่างกันไปตามพื้นที่ ระบบการเลี้ยงและฤดูกาล แม้จะมีรายงานว่าความรุนแรงของการติดเชื้อ EHP อาจเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูร้อนและในฟาร์มที่มีความหนาแน่นสูง (Sritunyalucksana et al., 2014) แต่ความชุกและรูปแบบการตรวจพบเชื้ออาจแตกต่างกันไปตามพื้นที่และสภาพแวดล้อมของแต่ละแหล่งเลี้ยง โดยจังหวัดนครศรีธรรมราชซึ่งเป็นศูนย์กลางการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวที่สำคัญของภาคใต้ มีการพบเชื้อ EHP ในหลายพื้นที่ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลดังกล่าวยังมีการเผยแพร่ในรูปแบบงานวิจัยค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะการสำรวจเชิงพื้นที่ที่ครอบคลุมและมีรูปแบบการเก็บตัวอย่างที่ชัดเจน รวมถึงการเปรียบเทียบระหว่างแหล่งที่มาของตัวอย่าง ดังนั้นการศึกษานี้จึง

มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการพบเชื้อ EHP ในกุ้งขาวในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราชและพื้นที่ใกล้เคียง โดยการเก็บตัวอย่างจากหลายแหล่งและกำหนดจำนวนตัวอย่างที่สม่ำเสมอ เพื่อให้ข้อมูลสามารถสะท้อนภาพรวมการกระจายของเชื้อในพื้นที่อย่างเป็นระบบมากขึ้น

การตรวจหาเชื้อ EHP สามารถทำได้หลายวิธีโดยการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง (Tangprasittipap et al., 2013) วิธีการตรวจอื่นๆ ได้แก่ การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (transmission electron microscopy) และเทคนิค in situ hybridization วิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดด้านความไวและความสะดวกในการใช้งาน (Tourtip et al., 2009) ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ เช่น quantitative PCR (qPCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP) และ CRISPR-Cas based detection ที่ให้ผลรวดเร็วและแม่นยำมากขึ้น (Tran et al., 2025) โดยการเลือกใช้เทคนิคการตรวจขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ ทรัพยากรที่มี และความต้องการด้านความแม่นยำ ซึ่งเทคนิค PCR ยังคงเป็นทางเลือกหลักสำหรับการสำรวจในระดับพื้นที่เนื่องจากความน่าเชื่อถือและต้นทุนที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. สำรวจการพบเชื้อ EHP ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในจังหวัดนครศรีธรรมราชและพื้นที่ใกล้เคียง ด้วยเทคนิค PCR เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวางแผนมาตรการป้องกันและควบคุมเชื้อ EHP ที่มีประสิทธิภาพ
2. เพื่อระบุงการเกิดโรคเพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรคในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวของจังหวัดนครศรีธรรมราช

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างกุ้งขาวแวนนาไมถูกสุ่มเก็บจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในจังหวัดนครศรีธรรมราชและจังหวัดตรัง และจากตลาดค้าของสดในจังหวัดนครศรีธรรมราช รวมทั้ง 15 จุด (ภาพที่ 1) โดยแบ่งเป็นฟาร์มในจังหวัดนครศรีธรรมราช 4 จุด ฟาร์มในจังหวัดตรัง 3 จุด และตลาดค้าของสด 8 จุด สำหรับตัวอย่างจากตลาดค้าของสด ได้มีการสอบถามแหล่งที่มาของกุ้งจากผู้จำหน่าย พบว่ามาจากฟาร์มในจังหวัดนครศรีธรรมราช 3 จุด จังหวัดสงขลา 1 จุด จังหวัดสุราษฎร์ธานี 2 จุด และจากแหล่งธรรมชาติ 2 จุด (ตารางที่ 1) การเก็บตัวอย่างเป็นไปโดยการสุ่มเก็บกุ้งจำนวน 5 ตัวอย่างต่อจุด จากนั้นเก็บตัวอย่างดับกึ่งในสารละลายเอทานอล 70% และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการสกัด DNA และตรวจหาเชื้อ EHP ต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงจุดเก็บตัวอย่าง พื้นที่และที่มาของตัวอย่างกุ้ง

จุดเก็บตัวอย่าง	พื้นที่	ที่มาของตัวอย่าง
site 1	อ. สิชล จ.นครศรีธรรมราช	ฟาร์ม
site 2	อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช	ฟาร์ม
site 3	อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช	ฟาร์ม
site 4	อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช	ฟาร์ม
site 5	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	ฟาร์ม
site 6	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	ฟาร์ม

ตารางที่ 1 แสดงจุดเก็บตัวอย่าง พื้นที่และที่มาของตัวอย่างกุ้ง (ต่อ)

จุดเก็บตัวอย่าง	พื้นที่	ที่มาของตัวอย่าง
site 7	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	ฟาร์ม
site 8	อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช	ฟาร์ม
site 9	อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช	ฟาร์ม
site 10	อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช	ฟาร์ม
site 11	อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช	ธรรมชาติ
site 12	อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช	ธรรมชาติ
site 13	จ.สงขลา	ฟาร์ม
site 14	จ.สงขลา	ฟาร์ม
site 15	จ.สุราษฎร์ธานี	ฟาร์ม



ภาพที่ 1 แสดงจุดเก็บตัวอย่างและที่มาของกุ้งขาวในพื้นที่ต่างๆ

2. การออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) จากฐานข้อมูล NCBI นำข้อมูลลำดับเบสที่พบมาออกแบบไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม primer blast โดยกำหนดค่าให้ PCR product มีขนาด 70-200 bp, ขนาดของไพรเมอร์อยู่ในช่วง 18-23 bp, primer melting temperature 57°C -62°C และ GC content 50-70% จากนั้นตรวจสอบ primer self-complementary โดยใช้โปรแกรม multiple primers analyzer จากนั้นจึงส่งลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ไปทำการสังเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

3. การสกัด DNA

ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 °C ถูกนำมาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, เยอรมัน) ตามคู่มือที่บริษัทกำหนดไว้ จากนั้นละลาย DNA ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ 50 µl แล้วจึงตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ DNA ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Thermo Scientific, USA) และ 1% agarose gel electrophoresis ด้วย 0.5X TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลา 40 นาที แล้วจึงถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล GelDoc Go Imaging System (BIO-RAD, USA)

4. การตรวจสอบหาเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค PCR

ทำการตรวจสอบหาเชื้อ EHP จากตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อจำนวน 6 ไพรเมอร์ประกอบด้วยไพรเมอร์จากงานวิจัยอื่นๆ 4 คู่และไพรเมอร์ที่ออกแบบจากงานวิจัยนี้จำนวน 2 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 2 ปฏิบัติ PCR ประกอบด้วย Genomic DNA 2 μ l, Forward primer 1 μ l, Reverse primer 1 μ l, PCR BIO Taq Mix Red 10 μ l (PCR Biosystems, UK) และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 6 μ l จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ในสภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 3) โดย normal PCR ทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ nested PCR ด้วยไพรเมอร์ตัวที่ 1 จำนวน 25 รอบและไพรเมอร์ตัวที่ 2 จำนวน 30 รอบ แล้วจึงตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ด้วย 0.5X TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลา 40 นาที และถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล GelDoc Go Imaging System (BIO-RAD, USA) โดยการตรวจสอบการมีอยู่ของเชื้อ EHP สามารถตรวจสอบได้จากการปรากฏของแถบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์แต่ละคู่ตามขนาดที่แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ วิธีการทำ PCR ขนาดผลผลิต PCR และ melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์แต่ละคู่

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5'-3')	วิธีการ ทำPCR	ขนาดผลผลิต PCR (bp)	T _m	อ้างอิง
EN779_F	CAGCAGGCGCGAAAATTGTCCA	Nested-PCR 1 st	779	59 °C	Tangprasittipap et al., 2013
EN779_R	AAGAGATATTGTATTGCGCTTGCTG				
EN176_F	CAACGCGGGGAAAACCTTACCA	2 nd	176	64 °C	
EN176_R	ACCTGTTATTGCCTTCTCCCTCC				
SWP_1F	TTGCAGAGTGTTGTTAAGGGTTT	Nested-PCR 1 st	514	57 °C	Jaroenlak et al., 2016
SWP_1R	CACGATGTGTCTTTGCAATTTTC				
SWP_2F	TTGGCGGCACAATTCTCAAACA	2 nd	148	60 °C	
SWP_2R	GCTGTTTGTCTCCAAGTATTTGA				
EHP2_F	GCCATCACAAATGTCCAGGT	Normal PCR	225	60 °C	งานวิจัยนี้
EHP2_R	AGTTCCTGATCAAACGCACG				
EHP4_F	GGTGGAGGCAGAGTGTAAGT	Normal PCR	202	61 °C	งานวิจัยนี้
EHP4_R	GTCTAGACCCACGCACTTA				

ตารางที่ 3 ตารางแสดงองค์ประกอบและปริมาณสารต่อปฏิกิริยา PCR และขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR	ปริมาณ/ ปฏิกิริยา	ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
DNA template	2 μ l	Initial Denature	95 °C	3 mins
Forward Primer (10 μ M)	1 μ l	Denature	95 °C	30 s
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	Annealing	ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ใช้	15 s
PCR BIO Taq Mix Red	10 μ l	Extension	72 °C	30 s
Sterile water	6 μ l	Final Extension	72 °C	1 min
Total volume	20 μ l	Holding	4 °C	∞

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

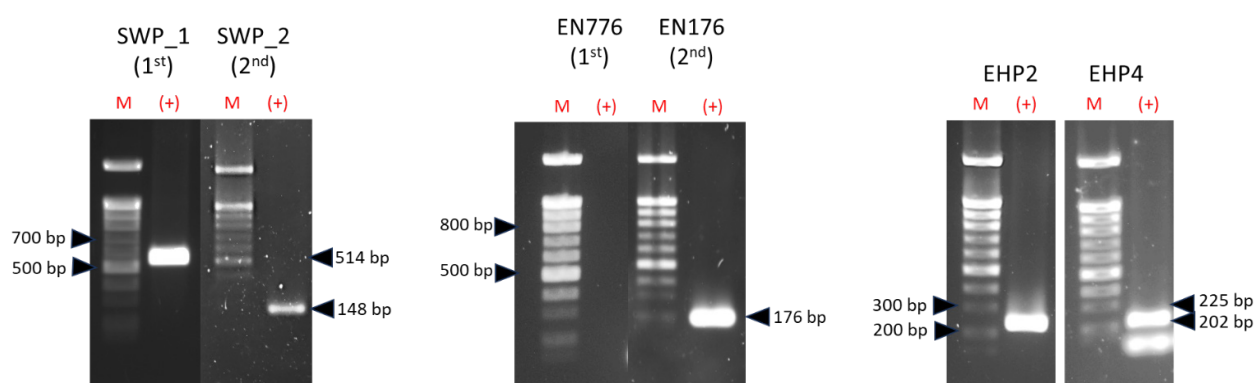
1. การออกแบบไพรเมอร์และการสกัดดีเอ็นเอ

ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ EHP พบว่า สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ EHP และให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดตรงตามที่คาดหมายจำนวน 2 คู่ คือ EHP2 (accession number: OQ581000.1) และ EHP4 (accession number: OL753005.1) ซึ่งผลผลิต PCR มีขนาด 225 bp และ 202 bp ตามลำดับ และอุณหภูมิที่ใช้ในการจับกันของไพรเมอร์ที่ 60 °C และ 61 °C ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างของกุ้งตัวอย่างพบว่ามีปริมาณและคุณภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณ PCR เพื่อตรวจสอบหาเชื้อ EHP

2. การตรวจสอบหาเชื้อ EHP ด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบหาเชื้อ EHP ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นมาใหม่จำนวน 2 คู่ ได้แก่ EHP2 และ EHP4 ร่วมกับไพรเมอร์จากการศึกษาของ Tangprasittipap et al (2013) และ Jaroenlak et al (2016) โดยผลการตรวจสอบจะแสดงแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ดังแสดงในภาพที่ 2

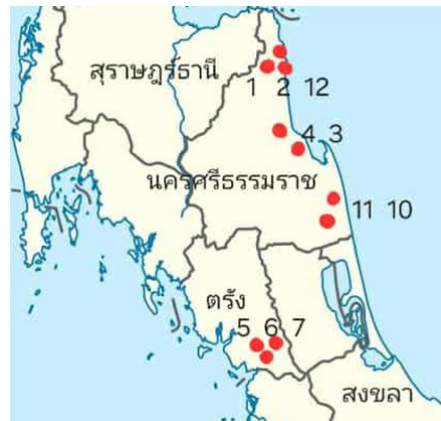


ภาพที่ 2 แสดงขนาดผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์แต่ละคู่ โดย M คือ DNA marker, (+) คือ EHP positive

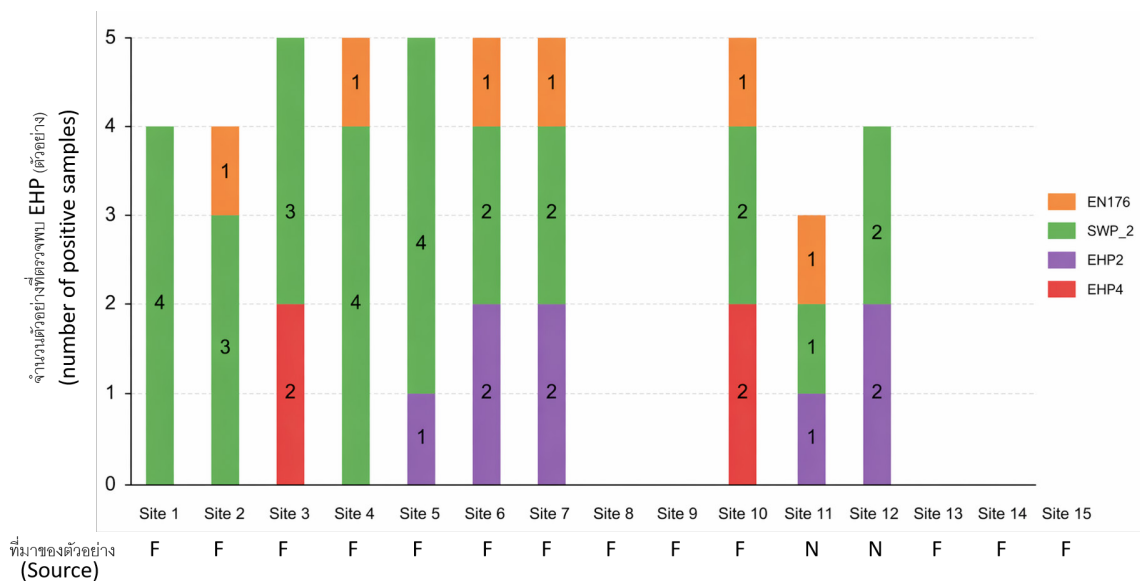
ผลการตรวจสอบ พบว่าการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างกุ้งจำนวน 10 จุด จาก 15 จุดสำรวจ คิดเป็นร้อยละ 66.7 ของพื้นที่ศึกษา (ภาพที่ 3) ซึ่งเป็นการกระจายของเชื้อในระดับพื้นที่ที่ค่อนข้างกว้าง และเมื่อจำแนกจากแหล่งที่มาของตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งมีการพบเชื้อจำนวน 8 จุด จาก 13 จุด คิดเป็นร้อยละ 61.5 แสดงให้เห็นการ

ติดเชื้อ EHP ในระบบการเพาะเลี้ยงในพื้นที่ศึกษา ในขณะที่ตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติพบการติดเชื้อในทุกจุดเก็บตัวอย่าง (2 จาก 2 จุด) คิดเป็นร้อยละ 100

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาระดับการตรวจพบเชื้อภายในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง พบว่าบางพื้นที่ที่มีจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกสูง (4-5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 5 ตัวอย่าง) ในขณะที่บางพื้นที่พบเชื้อในระดับต่ำ (1-2 ตัวอย่าง) แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของระดับการปนเปื้อนหรือความชุกของเชื้อ EHP ในแต่ละพื้นที่ ดังแสดงในภาพที่ 4 อย่างไรก็ตาม จำนวนจุดเก็บตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติมีน้อย จึงควรพิจารณาผลการเปรียบเทียบระหว่างแหล่งที่มาด้วยความระมัดระวัง



ภาพที่ 3 แสดงจุดเก็บตัวอย่างที่ตรวจพบการติดเชื้อ EHP



ภาพที่ 4 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ EHP จากตัวอย่างกึ่งด้วยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์แต่ละชุดในจุดสำรวจต่างๆ โดยแกน X แสดงจุดเก็บตัวอย่าง แกน Y แสดงจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ EHP (ตัวอย่าง) และ F = ฟาร์ม (farm) N= ธรรมชาติ (Natural)

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) มีการกระจายตัวในพื้นที่ศึกษาค่อนข้างกว้าง โดยตรวจพบเชื้อ 10 จุดจาก 15 จุดเก็บตัวอย่าง (ร้อยละ 66.7) สะท้อนให้เห็นการมีอยู่ของเชื้อทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงและในแหล่งธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sajiri et al (2021) ที่ระบุว่าเชื้อสามารถพบได้

ทั้งในฟาร์มและสิ่งแวดล้อม เมื่อพิจารณาตามแหล่งที่มาของตัวอย่าง พบว่าการติดเชื้อสามารถตรวจพบได้ทั้งในฟาร์มเลี้ยงกุ้งและในแหล่งธรรมชาติ โดยพบความชุกในฟาร์มร้อยละ 61.5 และในแหล่งธรรมชาติร้อยละ 100 ซึ่งอาจสะท้อนถึงความเป็นไปได้ของการแพร่กระจายแพร่กระจายเชื้อระหว่างระบบการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามตามจำนวนตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติมีน้อยจึงอาจเป็นข้อจำกัดในการตีความผล นอกจากนี้ความแตกต่างของระดับการตรวจพบเชื้อในแต่ละจุดเก็บตัวอย่าง ซึ่งพบตั้งแต่ระดับต่ำ (1-2 ตัวอย่างจาก 5 ตัวอย่าง) ไปจนถึงระดับสูง (4-5 ตัวอย่าง) อาจบ่งชี้ถึงความแตกต่างของระดับการปนเปื้อนของเชื้อ สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงหรือการจัดการฟาร์มที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่

ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าการตรวจหาเชื้อ EHP ควรใช้ไพรเมอร์มากกว่าหนึ่งชุด เนื่องจากไพรเมอร์แต่ละชุดมีความสามารถในการตรวจพบเชื้อแตกต่างกัน โดยไพรเมอร์ EN176 และไพรเมอร์ SWP_2 สามารถตรวจพบเชื้อได้ในจำนวนที่สูงกว่า ในขณะที่ไพรเมอร์บางชุดตรวจพบเชื้อได้เพียงบางส่วน การตรวจพบเชื้อในตัวอย่างเดียวกันจากไพรเมอร์มากกว่าหนึ่งชุดจะช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการตรวจ และลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดจากการใช้ไพรเมอร์เพียงชุดเดียว ในส่วนของไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นในการศึกษานี้ (EHP2 และ EHP4) แม้จะสามารถเพิ่มปริมาณ DNA และให้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดตรงตามที่คาดหวัง แสดงถึงความจำเพาะในระดับหนึ่งแต่ความสามารถในการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างจริงค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไพรเมอร์จากการศึกษาก่อนหน้า โดยตรวจพบเชื้อเพียง 4 และ 2 จุด ตามลำดับจากทั้งหมด 10 จุดที่มีการพบเชื้อ

ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ ความแตกต่างของ PCR เทคนิคที่ใช้ โดยไพรเมอร์จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ใช้เทคนิค Nested PCR ซึ่งมีความไวสูงกว่าวิธี PCR แบบปกติ (conventional PCR) ที่ใช้กับไพรเมอร์ EHP2 และ EHP4 เนื่องจาก nested PCR มีการขยายสัญญาณ 2 รอบ จึงสามารถตรวจพบเชื้อในตัวอย่างที่มีปริมาณต่ำได้ดีกว่า นอกจากนี้ ความผันแปรของลำดับพันธุกรรมของเชื้อในพื้นที่ศึกษาและความเหมาะสมของตำแหน่งยีนเป้าหมายที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการจับคู่ของไพรเมอร์ รวมถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิการจับและขนาดชิ้นส่วนของ DNA เป้าหมาย ล้วนส่งผลต่อประสิทธิภาพในการตรวจจับเชื้อ ดังนั้น แม้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นจะสามารถใช้งานได้ในระดับหนึ่ง แต่ยังไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อในพื้นที่ ซึ่งต้องอาศัยเครื่องมือที่มีความไวสูง ขณะที่ผลการสกัดดีเอ็นเอพบว่าตัวอย่างมีปริมาณและคุณภาพเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณ PCR แสดงให้เห็นว่าข้อจำกัดในการตรวจพบเชื้อไม่ได้เกิดจากคุณภาพของดีเอ็นเอ แต่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของไพรเมอร์และวิธีการตรวจเป็นหลัก

จากผลการสำรวจ พบการติดเชื้อ EHP ทั้งในพื้นที่เพาะเลี้ยงและแหล่งธรรมชาติ ซึ่งอาจอธิบายได้จากรูปแบบการแพร่กระจายของเชื้อที่มีความซับซ้อน โดยเชื้อสามารถแพร่กระจายได้ทั้งในแนวนอนผ่านการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมหรืออาหาร (Tang et al., 2016; Salachan et al., 2016) และในแนวตั้งจากพ่อแม่พันธุ์สู่ลูกกุ้ง (Aranguren et al., 2021) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการพบเชื้อในสิ่งมีชีวิตอื่นที่อาจทำหน้าที่เป็นพาหะ เช่น แมลงปอ ซึ่งสามารถมีบทบาทในการแพร่กระจายเชื้อในระบบนิเวศ (Dewangan et al., 2023) ปัจจัยดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงการหมุนเวียนของเชื้อในระบบนิเวศ ซึ่งส่งผลให้การควบคุมโรคทำได้ยาก โดยเฉพาะในระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่น ดังนั้น การจัดการสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมโรค

แม้การติดเชื้อ EHP จะไม่ทำให้กุ้งตายเฉียบพลัน แต่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ทำให้กุ้งโตช้า ขนาดไม่สม่ำเสมอและเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อร่วมอื่นๆ ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตและต้นทุนการเลี้ยงในระยะยาว อีกทั้งยังมีรายงานว่า EHP อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเสี่ยงของโรคตับและตับอ่อนวายเฉียบพลัน (AHPND) (Aranguren et al., 2017) และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของกุ้ง (Kumar et al., 2022) นอกจากนี้ แม้จะยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่แน่ชัด แต่ผลกระทบจากการเจริญเติบโตที่ลดลง ความไม่สม่ำเสมอของผลผลิตและต้นทุนการจัดการที่เพิ่มขึ้น ล้วนส่งผลกระทบต่อผู้ประกอบการโดยเฉพาะผู้ประกอบการ

การรายย่อย ดังนั้น การเฝ้าระวังและติดตามการแพร่กระจายของเชื้อ EHP อย่างต่อเนื่องจึงมีความสำคัญต่อการวางแผนควบคุมโรคและลดความเสี่ยงทางเศรษฐกิจ

อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้มีข้อจำกัดในแง่ การเก็บตัวอย่างในบางแหล่งมีจำนวนจำกัด และการออกแบบการศึกษาเป็นแบบเชิงสำรวจ ซึ่งไม่ได้มุ่งเน้นการวิเคราะห์เชิงสถิติของปัจจัยเสี่ยง ดังนั้นการศึกษาในอนาคตควรมีการออกแบบการเก็บตัวอย่างที่ครอบคลุมมากขึ้น และรวมถึงการวิเคราะห์ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเพื่อให้เข้าใจพลวัตของการแพร่กระจายของเชื้อได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

ควรมีการเก็บตัวอย่างในพื้นที่เดิมในช่วงเวลาที่แตกต่างกันและขยายพื้นที่ศึกษา เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมและสะท้อนรูปแบบการแพร่กระจายของเชื้อได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณกองทุนเพื่อการวิจัย นวัตกรรม และงานสร้างสรรค์ประจำปีงบประมาณ 2568 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

บรรณานุกรม

- กรมประมง. (2567). สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2566. ค้นเมื่อ 17 มิถุนายน 2568, จาก https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20240819161939_1_file.pdf.
- Aranguren Caro, L.F., Alghamdi, F., De Belder, K., Raigorodskaya, M., Nauwynck, H., Pensaert, M., & Sorgeloos, P. (2021). The effect of salinity on *enterocytozoon hepatopenaei* infection in *Penaeus vannamei* under experimental conditions. **BMC Veterinary Research**. 17 (1), P.65.
- Aranguren, L. F., Han, J. E., & Tang, K. F. (2017). *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is a risk factor for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 471 (2017), P.37-42.
- Chayaburakul, K., Nash, G., Pratanpipat, P., Sriurairatana, S., & Withyachumnarnkul, B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**. 60 (2004), P.89-96.
- Dewangan, N.K., Pang, J., Zhao, C., Cao, C., Yin, B., Weng, S., & He, J. (2023). Host and transmission route of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) between dragonfly and shrimp. **Aquaculture**. 574 (2023), P.1-9.
- Geetha, R., Avunje, S., Solanki, H.G., Priyadharshini, R., Vinoth, S., Anand, P.R., Panigrahi, A., Shyne Anand, P.S., Biju, N., Vijayan, K.K., & Patil, P.K. (2022). Farm-level economic cost of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) to Indian *Penaeus vannamei* shrimp farming. **Aquaculture**. 548 (2022), P.1-10.
- Jaroenlak, P., Sanguanrut, P., Williams, B.A.P., Stentiford, G.D., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K., & Itsathithpaisarn, O. (2016). A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farm. **PLOS ONE**. 11 (11), P.1-15.
- Kumar, T.S., Praveena, P.E., Sivaramakrishnan, T., Sahaya Rajan, J.J., Makesh, M., & Jithendran, K.P. (2022). Effect of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection on physiology, metabolism, immunity, and growth of *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**. 553 (2022), P.1-10.

- Kumar, V., Das, B.K., Dhar, S., Bisai, K., Pande, G.S.J., Zheng, X., Behera, B.K., & Jana, A.K. (2024). *Ecytonucleospora hepatopenaei* (EHP) disease prevalence and mortality in *Litopenaeus vannamei*: a comparative study from Eastern India shrimp farms. **BMC Microbiology**. 24 (1), P.1-13.
- Sajiri, W.M.H.W., Borkhanuddin, M.H., & Kua, BC. (2021). Occurrence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) infection on *Penaeus vannamei* in one rearing cycle. **Diseases of Aquatic Organisms**. 144 (2021), P.1-7.
- Salachan, P.V., Jaroenlak, P., Thitamadee, S., Itsathitphaisarn, O., Sritunyalucksana, K., Flegel, T.W., Krittanai, C., & Wannapapho, W. (2016). Laboratory cohabitation challenge model for shrimp hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP). **BMC Veterinary Research**. 13 (9), P.1-7.
- Sritunyalucksana, K., Wannapapho, W., Flegel, T.W., & Ubolratana, M. (2014). PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. **Journal of virology**. 80 (21), P.10734-10742.
- Stentiford, G.D., Neil, D.M., Peeler, E.J., Shields, J.D., Small, H.J., Flegel, T.W., Vlak, J.M., Jones, B., Morado, F., Moss, S., Lotz, J., Bartholomay, L., Behringer, D.C., Hauton, C., & Lightner, D.V. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal of Invertebrate Pathology**. 110 (2), P.141-157.
- Tang, K.F., Pantoja, C.R., Poulos, B.T., Redman, R.M., & Lightner, D.V. (2015). In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus. **Diseases of Aquatic Organisms**. 116 (3), P.179-187.
- Tang, K.F.J., Han, J.E., Aranguren, L.F., White-Noble, B., Schmidt, M.M., Piamsomboon, P., Risdiana, E., & Hanggono, B. (2016). Dense populations of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in feces of *Penaeus vannamei* exhibiting white feces syndrome and pathways of their transmission to healthy shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**. 140 (2016), P.1-7.
- Tangprasittipap, A., Srisala, J., Chouwdee, S., Somboon, M., Chuchird, N., Limsuwan, C., Srisuvan, T., Flegel, T.W., & Sritunyalucksana, K. (2013). The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **BMC Veterinary Research**. 9 (1), P.1-10.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyalucksana, K., & Withyachumnarnkul, B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. **Journal of Invertebrate Pathology**. 102 (1), P.21-29.
- Tran, H.D., Tran, T.H., Vo, T.T.B., Lee, T.K.D., & Phung T.T.H. (2025). On-Site Detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in Shrimp: A Rapid and Reliable Colorimetric PSR Method. **Research Journal of Biotechnology**. 20 (9), P.w109-117.