

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2546

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำแบบแถบสี
Development diagnostic kit for detection of yellow head virus in
Penaeus monodon : Strip test

15 ส.ค. 2547

ไพศาล สิทธิกรกุล ศิวาพร ลงยันต์ สมบัติ รักประทานพร
ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และ วีระวรรณ สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

1
h 237787

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัดเหลืองในกึ่งภูลาดำชนิดแถบสี เป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยเรื่อง การตรวจวินิจฉัยและการป้องกันโรคไวรัสในกึ่งภูลาดำ และเป็นโครงการต่อเนื่องจากการพัฒนาชุดตรวจแบบ Sandwich ELISA เพื่อพัฒนาชุดตรวจที่สามารถใช้ได้ง่ายและลดขั้นตอนต่าง ๆ ลง สามารถใช้โดยบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความจำเป็นต้องมีความรู้ทางวิทยาศาสตร์และสามารถนำออกใช้ในภาคสนามได้ทุกแห่ง นอกจากนี้ผลการตรวจยังสามารถรู้ผลได้ทันทีโดยใช้เวลาเพียงประมาณ 1 นาที โดยโครงการนี้เป็นการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถผลิตได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยมาพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจง่าย ๆ ที่เกษตรกรและบุคคลทั่วไปสามารถใช้ได้ แต่อย่างไรก็ดีชุดตรวจนี้สามารถใช้ได้ง่ายก็จริงแต่ก็ต้องแลกกับข้อด้อยบางประการของเทคนิคได้แก่ ความไวของเทคนิคย่อมลดลงเนื่องจากการตรวจสอบด้วยตา และใช้สารที่ก่อให้เกิดสัติดฉลากโดยตรงกับแอนติบอดีทำให้ไม่มีการขยายสัญญาณให้เพิ่มขึ้น ดังนั้นชุดตรวจนี้จึงสามารถใช้ตรวจเพื่อยืนยันผลการติดเชื้อและคัดเลือกว่ามีการติดเชื้อเบื้องต้นในกึ่งแต่ละตัวสำหรับกึ่งที่มีการติดเชื้อพอสมควรเท่านั้น ในกรณีที่ให้ผลลบควรมีการยืนยันสภาพปลอดเชื้อโดยวิธี RT-PCR อีกครั้ง

ในโอกาสนี้คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับโครงการนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ และคุณนิลวรรณ เพชรบุรณิน ประธานบริษัท Pacific Biotech Co. Ltd. และพนักงานที่ให้ความช่วยเหลือในการประกอบชุดตรวจซึ่งทำให้การผลิตชุดตรวจได้ผลอย่างดี

คณะผู้วิจัย
ธันวาคม 2546

สารบัญ

หน้า

บทนำ	1
โรคหั่วเหลือง	2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีการทดลอง	11
สัตว์ทดลอง	12
การเตรียมไวรัสโรคหั่วเหลือง (YHV)	12
การเตรียม rabbit anti YHV antibody	12
การทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry	13
การเตรียม ascites fluid ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี	14
การเตรียม V3-2B antibody colloidal gold conjugate	14
การประกอบชุดทดสอบ	14
การตรวจสอบความไวของ strip test	15
การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR	15
ผลการทดลอง	17
สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	27

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	กึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง3
2	เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง4
3	Electron microscope แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลือง6
4	แผนภูมิแสดงสรุปการทดลอง16
5	SDS-PAGE และ Western blot ของ haemolymph และ YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์จากกึ่งกลาดำ20
6	Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำ21
7	RT-PCR ของhaemolymph จากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV22
8	ขั้นตอนการใช้ชุดตรวจสอบไวรัสโรคหัวเหลืองแบบแถบสี26

บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow head virus = YHV) ชนิดแถบสีทำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B เชื่อมต่อกับ colloidal gold ใส่ในแผ่นดูดซับประกอบด้านหนึ่งของแถบ nitrocellulose membrane ที่มี rabbit anti YHV antibody และ goat anti mouse IgG antibody ตรึงขวางอยู่เป็นขีดตามลำดับ อีกด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane มีแผ่นดูดซับเพื่อใช้สำหรับดูดซับสารละลายที่มาจากแผ่นดูดซับด้านแรกและนำมาประกอบในตลับพลาสติก บรรจุในถุงพลาสติกป้องกันความชื้นเพื่อสะดวกในการเก็บรักษาและใช้ วิธีการใช้ชุดตรวจสามารถทำได้โดยง่ายโดยการดูดสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 200 ไมโครลิตรเข้าในเข็มฉีดยาและดูดเลือดกึ่งที่ต้องการตรวจ ผสมกันก่อนหยดใส่ในช่องบนแผ่นดูดซับส่วนแรกและปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน nitrocellulose membrane ไปยังแผ่นดูดซับอีกด้านหนึ่ง ถ้าปรากฏสีม่วงแดง 2 แถบบนแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่าตัวอย่างมีการติดเชื้อ YHV วิธีนี้สามารถใช้ตรวจตัวอย่างจากเนื้อเยื่อกึ่งได้โดยการบดตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมให้และดูดเฉพาะส่วนน้ำใสมาทดสอบ สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างกึ่งแต่ละตัวได้ แต่วิธีนี้มีความไวต่ำกว่า one step RT-PCR ประมาณ 200 เท่า จึงสามารถใช้ในการคัดเลือกกึ่งที่ติดเชื้อเบื้องต้นและยืนยันผลการติดเชื้อ YHV แต่ข้อดีของวิธีการนี้ได้แก่ ความง่าย สะดวก รวดเร็วในการตรวจโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใด ๆ สามารถทำได้โดยเกษตรกรและบุคคลทั่วไปได้

ABSTRACT

Simple yellow head virus (YHV) detection strip test kit was developed using monoclonal antibody V3-2B (against gp 116 structural protein) colloidal gold conjugated. The conjugated antibody was placed on the sample absorbing pad at the end of nitrocellulose membrane strip (3.5 X 60 mm) and rabbit anti YHV antibody as well as goat anti mouse Ig were streaked across consecutively. Another absorbing pad was assembly at the opposite end of nitrocellulose strip for collecting the test solution. The ready to use strip was held in a plastic case for convenient usage and storage and stored in desiccated plastic bag. About 100 μ l of haemolymph from shrimp was withdrawn into a syringe and mixed with 200 μ l of anti-coagulant, then about 200 μ l of the mixture was applied to the sample receptacle chamber and let the solution flow pass through the nitrocellulose membrane to the other end. The positive sample will show red purple bands at the test line (T) and control line (C). Sample of homogenate shrimp tissue can be used by applying the supernatant instead of haemolymph. The sensitivity of this method was about 200 times lowers than that of one step RT-PCR. Therefore, it can be used for primary screening of individual shrimp and confirmation of the YHV infection. The beneficial features of this kit are simple and fast and it can be used by any people without any additional tool or equipment.

บทนำ

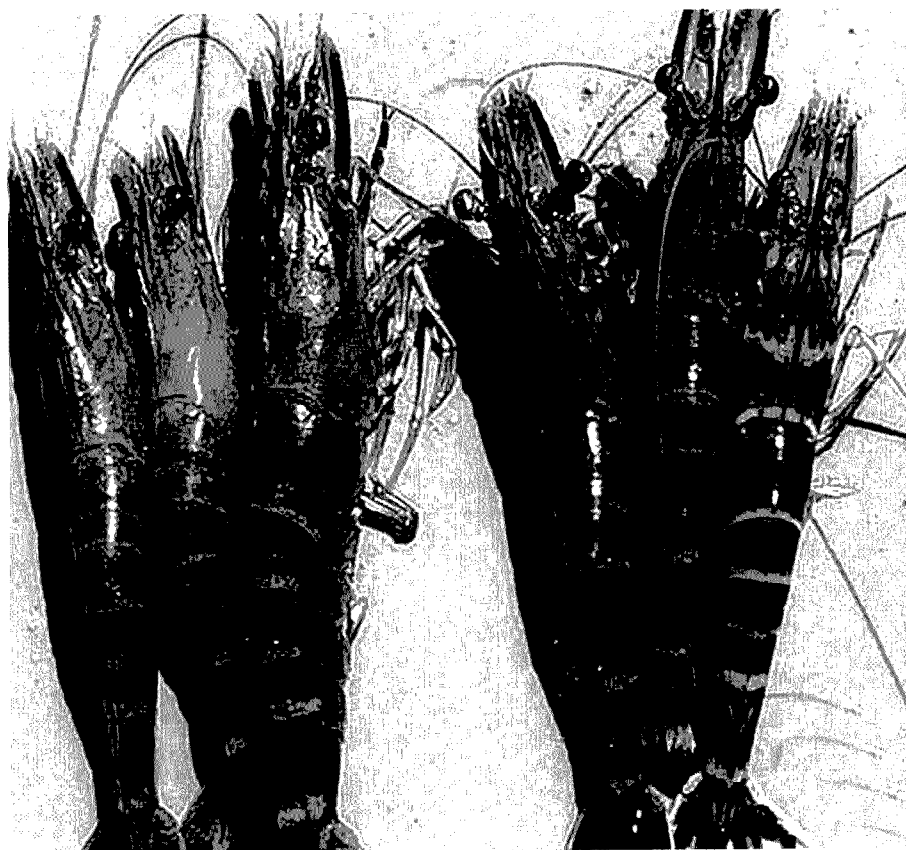
การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย สามารถทำรายได้เข้าสู่ประเทศได้อย่างมาก อย่างไรก็ตามในระยะหลังนี้การติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (yellow-head virus : YHV) และไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus : WSSV) (Boonyaratpalin et al., 1993; Wongteerasupaya et al., 1995) ได้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยพบว่าในปี 2538 การผลิตกุ้งจากประเทศไทยลดลงจากปี 2537 ถึงประมาณ 30,000 ตันโดยคิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 9600 ล้านบาท (Flegel et al., 1997) ดังนั้นการวินิจฉัยและการป้องกันการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV ในกุ้งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) จำเพาะต่อโรคหัวเหลือง ซึ่งผลิตจากห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัย (Sithigorngul et al., 2000) เพื่อนำไปใช้ในการใช้ในห้องปฏิบัติการและพัฒนารูปแบบอื่น ๆ เพื่อที่จะสามารถใช้โดยเกษตรกรได้ต่อไป ซึ่งการพัฒนาชุดตรวจ YHV ในโครงการแรก Sandwich ELISA เป็นการพัฒนาชุดตรวจที่มีราคาถูกกว่าและมีความไวใกล้เคียงกับ RT-PCR ได้สำเร็จ แต่เนื่องจากวิธีการนี้ยังค่อนข้างมีความยุ่งยากพอสมควรต้องทำในห้องปฏิบัติการและใช้เครื่องมือหลายชิ้นที่มีราคาค่อนข้างแพง ถึงแม้ราคาในการตรวจต่อตัวอย่างจะมีราคาถูกกว่า RT-PCR มากก็ตาม ยังจำเป็นต้องพัฒนาวิธีให้ลดเวลาและการใช้เครื่องมือให้น้อยลง แต่อย่างไรก็ตามจากการพัฒนาชุดตรวจนี้สามารถใช้เป็นพื้นฐานการพัฒนาชุดตรวจอีกรูปแบบหนึ่ง ได้แก่ direct colloidal gold conjugate sandwich strip test ซึ่งในที่นี้จะใช้เพียงข้อสั้น ๆ ว่า strip test ซึ่งสามารถใช้โดยเกษตรกรทั่ว ๆ ไปได้ในราคาที่ไม่แพงนัก

โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลืองเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นการค้าไม่เฉพาะประเทศไทยเท่านั้น ยังรวมไปถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮาวาย และประเทศแถบตะวันตก (Lu et al., 1994, 1995) โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำมีรายงานครั้งแรกบริเวณภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศ เมื่อปี 2533 ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การระบาดของโรคหัวเหลืองบริเวณภาคใต้ของประเทศพบครั้งแรกจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงต้นปี 2535 หลังจากนั้นในราวปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม โรคหัวเหลืองได้แพร่ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณรอบทะเลสาบสงขลาและแพร่เข้าสู่จังหวัดปัตตานีในราวกลางเดือนมิถุนายน (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535) การตรวจลักษณะ

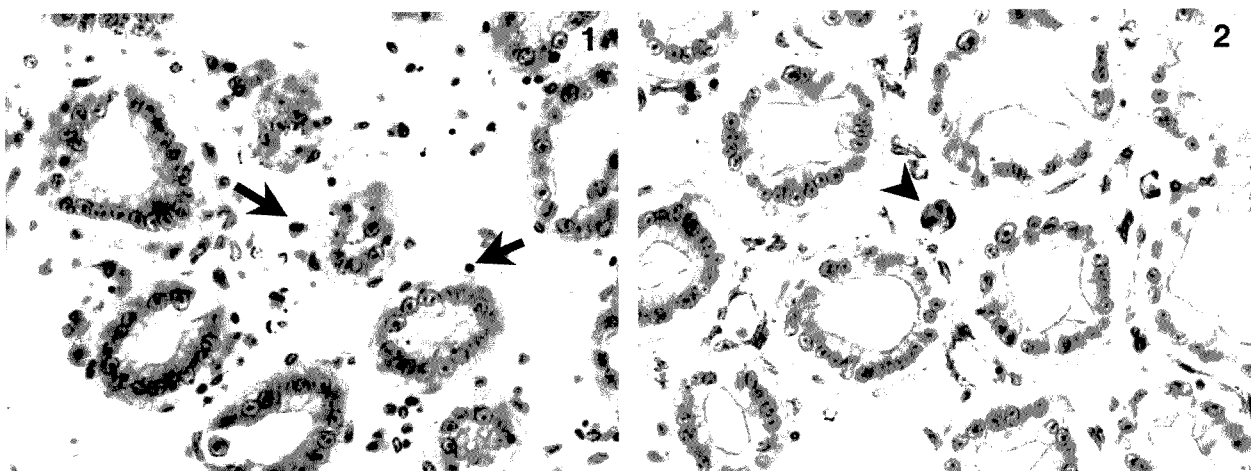
การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ สามารถตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในบริเวณเหงือก ในเซลล์เม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง ในกุ้งที่ปรากฏอาการเป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งทำให้ส่วนหัว ตับ-ตับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลืองเห็นได้ชัดเจน พยาธิสภาพของกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ถ้ากุ้งได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วยโดยจะส่งผลให้มีอัตราการตาย 100% ภายใน 3-5 วันหลังจากได้รับเชื้อซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก (ชลอ ลัมสุวรรณ. 2543 ; สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)

สำหรับกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลืองจะมีลักษณะอาการดังนี้คือ กุ้งมาเกยอยู่บริเวณขอบบ่อ การกินอาหารจะลดลงจนผิดสังเกต กุ้งมีอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรงติด ลำตัวซีด ส่วนหัวซึ่งเป็นส่วนตับ ตับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลือง (รูปที่ 1) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในวันที่สองหลังจากที่เริ่มเห็นอาการของโรค กุ้งจะตายเพิ่มขึ้นประมาณ 50% และ 70% ในวันที่สาม กุ้งจะตายหมดหรือเกือบหมดในวันที่สี่และห้าหลังจากเริ่มมีอาการให้เห็น (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)



รูปที่ 1 กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง (ซ้าย) สังเกตบริเวณหัวซึ่งเป็นส่วนของตับ-ตับอ่อนและเหงือกมีสีเหลืองและซีดกว่ากุ้งกุลาดำปกติ (ขวา)

เมื่อตรวจวิเคราะห์กึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ เช่น บริเวณเหงือกในกึ่งที่เป็นโรคหัวเหลือง เซลล์ภายในซี่เหงือก (pillar cell) จะบวม เกิดการตายและสลายตัวของเซลล์และออร์แกเนลล์ในส่วนนี้ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดระหว่าง pillar cell มากขึ้น มีการขยายตัวของท่อเลือด (lacuna) ใหญ่กว่าปกติ อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกึ่งที่เป็นโรคจะเกิดการตายและเสื่อมสลายของเซลล์ รวมทั้งมีลักษณะของ granuloma เพิ่มมาก มีการคั่งของฮีโมลิมป์ (haemolymph) และการขยายตัวในส่วนของ hemal sinus นอกจากนี้พบว่าการบวมพองของนิวเคลียสในเซลล์ของอวัยวะน้ำเหลืองทั่วไป ตรวจพบ dense bodies ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับอ่อน เหงือก และอวัยวะน้ำเหลือง เมื่อนำมาย้อมด้วย Feulgen reaction พบว่า dense bodies จะติดสีชมพูเข้มอยู่ภายใน cytoplasm (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535 ; Chantanachookin et al. 1993) (รูปที่ 2)

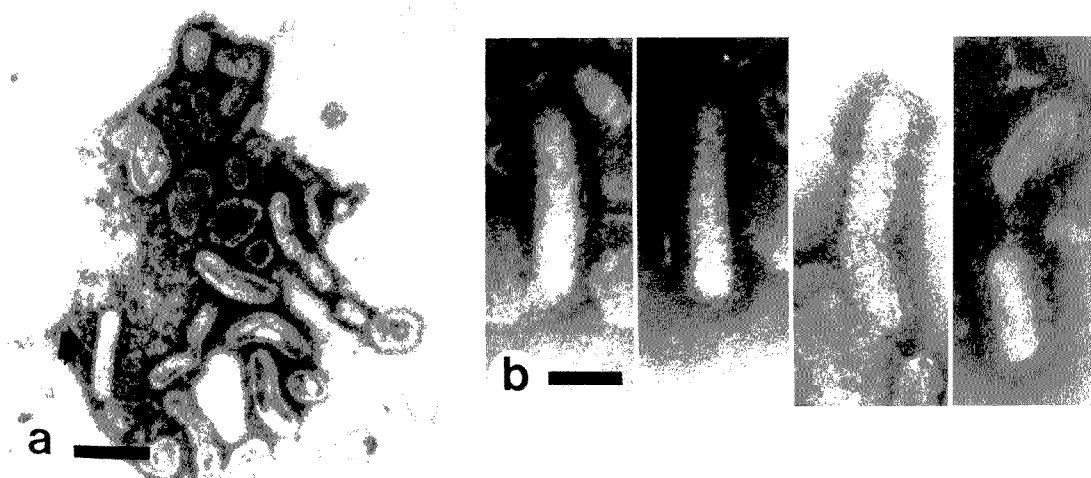


รูปที่ 2 เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง (1) การตรวจสอบด้วยวิธีทาง histology เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเห็นลักษณะของนิวเคลียสรวมกัน (pycnotic nuclei) (ลูกศร) (2) การตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry เซลล์ที่พบไวรัสจะติดสีน้ำตาลและแสดงความผิดปกติของนิวเคลียส (หัวลูกศร)

นอกจากจะพบโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำแล้ว ยังพบการติดเชื้อโรคนี้ในกุ้งอีกหลายชนิดในประเทศต่าง ๆ ได้แก่ กุ้ง blue shrimp *Penaeus stylirostris* และกุ้ง white shrimp *Penaeus vannamei* อีกด้วย (Lu et al., 1994; Lu et al., 1995) จนกระทั่งปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานถึงการต้านทานต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกุ้งสปีชีส์ต่าง ๆ (Lightner and Redman.1998)

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและย้อมด้วยวิธี negative stain พบว่า ไวรัสหัวเหลืองมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 50–60 x 190–200 nm ภายในเป็น nucleocapsid ล้อมรอบด้วย envelope ปุ่มปมหรือหนาม (Nadala et al., 1997) เมื่อศึกษาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าไวรัสนี้มีสารพันธุกรรม (genome) ชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (sRNA) (Wongteerasupaya et al., 1995) (รูปที่ 3) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของไวรัสด้วยวิธี SDS- PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่าประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 170 135 67 และ 22 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วย Western blot โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนัก 135 กิโลดาลตันเป็น glycosylated protein ซึ่งมีลักษณะคล้าย Rhabdovirus (Nadala et al., 1997) แต่ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่า genome ของ YHV เป็น positive-sense RNA (Tang and Lightner. 1998) ซึ่งจากการศึกษาลำดับเบส พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ gill-associated virus (GAV) จากออสเตอร์เลีย (Cowley et al., 1999) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวและการแสดงออกของยีนคล้ายกับ coronaviruses, toroviruses และ arteriviruses จึงได้จัด YHV และ GAV ใน genus Okavirus family Roniviridae รวมอยู่ใน order Nidovirales (Cowley et al., 2000 ; Sittidilokratna et al., 2002) และจากการพิสูจน์ทราบโครงสร้างของยีนส่วนประกอบของโปรตีนโครงสร้างของ YHV พบว่าประกอบด้วยโปรตีนขนาด 116 64 และ 20 kD (Jitrapakdee et al., 2003) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าที่รายงานโดย Nadala et al. (1997) เล็กน้อย ในรายงานฉบับนี้จึงขอใช้ขนาดของโปรตีนตามรายงานล่าสุดนี้

ปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีหรือยาใด ๆ รักษาโรคหัวเหลืองได้ ดังนั้นวิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่นักวิชาการหลายกลุ่มทำการศึกษาเพื่อเสนอแนะวิธีการป้องกันที่ดีที่สุดแก่ผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ การจัดการที่ดีทั้งในเรื่องอาหาร น้ำ และพื้นบ่อจะลดโอกาสการเกิดโรคได้มาก หลีกเลี่ยงการใช้อาหารสดในการเลี้ยงกุ้ง รักษาสภาพพื้นบ่อให้สะอาด รวมทั้งไม่ใช้อุปกรณ์ระหว่างบ่อเลี้ยงปนกัน การเพาะเลี้ยงระบบปิดและการตรวจคุณภาพน้ำ (ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543; Flegel and Sriurairatana. 1993) นอกจากนี้การกำจัดสัตว์ต่าง ๆ เช่น กุ้ง ปู และอาร์โทรพอด (arthropod) อื่น ๆ ที่เชื่อว่าจะ เป็นพาหะของไวรัสหัวเหลืองก่อนปล่อยลงบ่อเลี้ยง ก็จะเป็นการป้องกันการระบาดของไวรัสหัว



รูปที่ 3 Electron microscope แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลืองเตรียมโดย negative staining
 a. ภาพกำลังขยายต่ำ scale bar = 150 nm b. ภาพกำลังขยายสูง scale bar = 50 nm
 (Wongteerasupaya et al., 1995)

เหลืองได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์เหล่านี้เข้ามาสู่ระบบการเลี้ยงกุง อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันเหล่านี้ก็ไม่ใช่วิธีการที่ดีที่สุด เนื่องจาก ลูกกุงที่นำมาเลี้ยงอาจได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองมาจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีเชื้ออยู่ก่อนแล้ว

การป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคหัวเหลือง ในปัจจุบันทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และลูกกุงวัยอ่อน ก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์ม โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจจับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกุงที่เป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งวิธีการนี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้ได้จำนวนมาก ทำให้ผู้ตรวจวินิจฉัยสามารถตรวจเชื้อไวรัสนี้ได้แม้จะมีปริมาณน้อย วิธีการนี้จะช่วยลดเวลาในการตรวจได้รวดเร็วมีความไวสูง (Wongteerasupaya et al., 1997) ถึงแม้ว่า RT-PCR จะเป็นเทคนิคที่ปัจจุบันได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะทางและบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถ และความชำนาญทางเทคนิค RT-PCR เป็นอย่างดี นอกจากนี้ราคาในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างค่อนข้างสูงในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากค่าตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทาง PCR มีราคาค่อนข้างสูง (ประมาณ 800 บาทต่อตัวอย่าง) ทั้งไม่สามารถรับรองความแม่นยำตลอดการนำผลมาเทียบเคียงกันระหว่างห้องปฏิบัติการได้

เนื่องจากแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน และวิธีการสุ่มตัวอย่างที่จะนำมาตรวจวินิจฉัยก็แตกต่างกันไปด้วย หากมีผลการตรวจที่ขัดแย้งกัน อาจทำให้เกิดความสับสนขึ้นกับผู้ใช้บริการได้ และส่งผลให้ผู้ให้บริการเกิดความไม่มั่นใจในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีการนี้ และด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้เทคนิค RT-PCR มีข้อจำกัดในด้านการใช้

สำหรับวิธีตรวจอื่น ๆ อย่างเช่น การตรวจทางชิ้นเนื้อและพยาธิวิทยา (histopathology) และการตรวจโดยการดูอาการของโรค (symptomatic diagnosis) ก็ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ (Lightner and Redman, 1998) โดยทั่วไปแล้วตัวอย่างที่นำมาตรวจมักอยู่ในสภาพเสียหายเนื่องจากไม่ได้รับการเก็บรักษาอย่างถูกต้องและอาการของโรคมักจะมีการเกี่ยวข้องกับ การติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ด้วย ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเหล่านี้ก็จะไม่ให้ผลที่น่าเชื่อถือในทาง ระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส YHV

เมื่อ 3 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานถึงการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีซีรัมเพื่อใช้ในการวินิจฉัย การติดเชื้อไวรัส YHV และ WSSV (Loh et al., 1997) โดยวิธี Western blot อย่างไรก็ตามการใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดีซีรัมเพื่อการวินิจฉัยยังมีความไวต่ำและวิธี Western blot ก็ไม่เหมาะสมในการ วินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก

อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยสามารถประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้นี้มีความจำเพาะต่อโปรตีน ส่วนประกอบของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 116 kD ซึ่งคาดว่าจะเป็นส่วนของไกลโค โปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelope) ของ YHV (Nadala et al., 1997) โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ทั้งในสภาวะปกติ (native form) และในสภาวะที่ถูกทำให้เสีย สภาพ (denatured form) และพบว่าแอนติบอดีนี้ไม่ทำปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อจากกุ้งปกติซึ่งไม่ได้รับเชื้อ YHV

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่เป็น โครงสร้างของ YHV ขนาด gp116, gp64 และ gp20 kD เพิ่มเติมได้ (Sithigorngul et al., 2002) โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล gp116, gp64 และ gp22 kD ทั้งในรูปของ native form และรูปของ denatured form และแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot และ immunohistochemistry ได้

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยตรงสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ immunohistochemistry, dot blot และ Western blot แต่ในแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกันคือ

-Immunohistochemistry เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก สามารถใช้วินิจฉัย เนื้อเยื่อและ haemocyte ของกุ้งที่ติดเชื้อเพียงเล็กน้อยโดยที่กุ้งยังไม่แสดงอาการของโรค (Sithigorngul et al., 2000) แต่มีข้อจำกัดที่ว่าวิธีนี้ต้องทำในห้องปฏิบัติการ เพราะต้องผ่านกระบวนการ

การเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้ paraffin section ซึ่งกินเวลามากถึง 3 วัน สิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีมาก ไม่สะดวกในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ต้องตรวจดูจาก section บาง ๆ สามารถตรวจดูได้เพียงบริเวณแคบ ๆ ถ้าการติดเชื่อมมีน้อยอาจตรวจไม่พบ

-Dot blot เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วสามารถทำได้ง่ายนอกห้องปฏิบัติการ เพราะไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน สามารถเจาะเลือดมาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสและผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method ประมาณ 6 ชั่วโมง แต่วิธีนี้มีความไวค่อนข้างต่ำใช้ได้ดีกรณีที่กึ่งติดเชื่อมมาก และนอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาก่อให้เกิด background staining เนื่องจากการจับของแอนติบอดีกับองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเลือดแบบไม่จำเพาะ ทำให้เกิดความสับสนกรณีที่ติดเชื่อมปริมาณน้อยจึงทำให้ความแม่นยำต่ำ

-Western blot เป็นวิธีคล้ายกับ dot blot แต่ทำการแยกโปรตีนของไวรัสก่อนแล้วจึงผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method จึงต้องเพิ่มเวลาในการแยกโปรตีนและย้ายโปรตีนลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสทำให้ใช้เวลาเพิ่มขึ้น ความแม่นยำจะสูง แต่ความไวยังคงต่ำเช่นกันและต้องทำในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

การศึกษาในโครงการที่ผ่านมาเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไว โดยการใช้อันติบอดีจำเพาะต่อไวรัส ตีรังและรวบรวมไวรัสในหลุมของ ELISA plate แล้วจึงผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method สำหรับตรวจสอบไวรัสทำให้สามารถใช้ตัวอย่างในการตรวจสอบปริมาณมากได้และทำได้ทั้งการตรวจไวรัสในเลือดหรือเนื้อเยื่อก็ได้ ซึ่งความไวในการตรวจใกล้เคียงกับวิธี RT-PCR (ไพศาลและคณะ 2546) แต่เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือหลายชิ้น ได้แก่ 8 channel micropipette และ ELISA reader และการตรวจในแต่ละครั้งสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมาก (80-88 ตัวอย่าง) ต่อ plate ดังนั้นวิธีการตรวจนี้จึงเหมาะสำหรับทำในห้องปฏิบัติการ สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการพัฒนาต่อให้ใช้ได้ง่ายขึ้น สำหรับเกษตรกรและบุคคลทั่ว ๆ ไป คล้ายกับชุดตรวจการตั้งครรภ์ซึ่งสามารถทราบผลได้ทันทีและใช้กับการตรวจที่ละตัวอย่างเท่านั้น

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wongteerasupaya et al. (1997) ได้พัฒนา RT-PCR สำหรับตรวจการติดเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยใช้ primer ขนาด 135 bp สามารถใช้ตรวจไวรัสปริมาณน้อยมาก ประมาณ 0.01 pg ของ YHV-RNA และตรวจพบไวรัสในเลือดกุ้งหลังจากฉีดด้วยสารสกัดจากเหงือกกุ้งที่ติดเชื้อตั้งแต่ 6-12 ชั่วโมง

Loh et al. (1997) และ Nadala et al. (1997) ได้ผลิตแอนติซีรั่มต่อเชื้อ YHV และใช้ Western blot ในการตรวจการติดเชื้อ YHV ในกุ้ง *Penaeus vanamei* พบว่าแอนติซีรั่มสามารถตรวจพบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 170, 135, 67 และ 22 kDa และสามารถใช้ในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหลังจากกุ้งได้รับการฉีดไวรัสตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไป

Poulos et al. (1999) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ Taura syndrome virus (TSV) และสามารถใช่วิธี dot blot และ Western blot ในการตรวจหาไวรัสจาก haemolymph ของกุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงได้ แต่ในกรณีของกุ้งที่ติดเชื้อเรื้อรังผลการตรวจยังค่อนข้างแปรปรวนต้องพัฒนาให้มีความไวสูงขึ้น

Nadala et al. (2000) ได้ใช้เทคนิค dot blot ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV ในกุ้ง *Penaeus vanamei* โดยใช้ rabbit anti-YHV Ig HRP conjugate พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสในสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสที่เจือจาง 1:10 เท่า ซึ่งมีความไวค่อนข้างต่ำ

Sithigorngul et al. (2000) ได้พัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ YHV โดยแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kD ซึ่งสามารถใช้ตรวจเชื้อไวรัสได้ โดยมีความไวและความจำเพาะสูงโดยใช่วิธี dot blot, Western blot และ immunocytochemistry ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ โดยเฉพาะวิธี immunocytochemistry สามารถตรวจพบการติดเชื้อ YHV ได้แม้ในกุ้งที่ยังไม่แสดงอาการของโรคก็ตาม

Sithigorngul et al. (2002) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV เพิ่มเติมขนาด 22, 67 และ 135 kD จากการปลูกภูมิคุ้มกันหนูเมาส์ด้วย YHV ที่ทำให้บริสุทธ์บางส่วนจาก haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV โดยการฉีด สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 4 กลุ่ม แอนติบอดีกลุ่มแรกสามารถจับกับ native protein ของ YHV ขณะที่อีก 3 กลุ่มที่เหลือสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD ทั้งในรูปของ native form และรูปของ denatured form แอนติบอดีทั้งหมดสามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot และ immunohistochemistry อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนขนาด 22 kD จะให้ผลการศึกษาด้วยวิธี immunohistochemistry ดีที่สุดในแง่ของความเข้มและความชัดในการย้อม

สำหรับรายงานการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยโรคในกุ้งมีการใช้ในการตรวจโรค WSSV ได้แก่การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VP28 protein ของ WSSV โดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนูด้วย WSSV บริสุทธ์ ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 โคลนที่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry (Poulos et al., 2001) สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ WSSV โดยใช้ recombinant VP28 สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 3 โคลนซึ่งสามารถนำไปพัฒนาติดสลากระหว่าง biotin สำหรับตรวจการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี antigen capture ELISA พบว่ามีความไวใกล้เคียงกับ PCR (Lui et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไวรัสบริสุทธ์ได้ 4 โคลนซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี dot blot (Anil et al., 2002)

ในรายงานผลการทดลองพัฒนาชุดตรวจสอบ YHV โดย indirect sandwich ELISA โดยใช้ rabbit anti YHV เป็น capture antibody โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B และ Y19 เป็น detector antibody และ rabbit anti mouse IgG เป็น reporting antibody พบว่าความไวในการตรวจ YHV

ใกล้เคียงกับ RT-PCR โดยมีความไวต่ำกว่าประมาณ 4-5 เท่าสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละอย่างน้อย 80 ตัวอย่าง/ถาด ในราคาที่ต่ำ แต่ยังคงใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงในการตรวจสอบผล และต้องทำในห้องปฏิบัติการ (ไพศาล และคณะ 2546) ดังนั้นในรายงานนี้จึงเป็นการพัฒนาต่อจากวิธีการดังกล่าวเพื่อให้ได้ชุดตรวจที่ง่ายสามารถทำการทดสอบในภาคสนาม รู้ผลรวดเร็ว ราคาไม่แพง และสามารถใช้ได้โดยบุคคลทั่ว ๆ ไป

วิธีการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ซื้อจากฟาร์มใกล้เคียงกรุงเทพ ฯ ขนาด 20-30 กรัม นำมาเลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 10 ppt กุ้งก้ามกรามซื้อจากจังหวัดอยุธยา ขนาด 15-30 กรัม นำมาเลี้ยงในน้ำจืดสำหรับเก็บเลือดเพื่อใช้เจาะงาเลือดกุ้งกุลาดำและเป็น negative control สำหรับตัวอย่างที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

2. การเตรียมไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV)

นำกุ้งกุลาดำฉีดด้วย haemolymph จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส YHV เจือจาง 1 : 1000 สังเกตการติดเชื้อประมาณ 2-3 วัน เลือกกุ้งที่แสดงอาการติดเชื้อนำมาเจาะเลือดผสมกับน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Rodriguez et al., 1995) ในอัตราส่วน 1 : 1 ปั่นแยกตะกอนและเซลล์เม็ดเลือดออกที่ 3000 g นำ supernatant มาตกตะกอนที่ 33 % saturated ammonium sulfate ละลายตะกอนด้วยใน 2X PBS นำไปปั่นที่ 3000 g แยกส่วนของตะกอนที่ไม่ละลายออกก่อนนำไปปั่นแยกไวรัสที่ 100,000 g เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 2X PBS 2 ครั้ง ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 2X PBS หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford et al. (1976) แบ่งเป็นส่วนย่อย ๆ หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -70°C ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไวรัสที่ได้โดย SDS-PAGE และ Western blot

3. การเตรียม rabbit anti YHV antibody (r α YHV Ab)

3.1 นำไวรัส YHV ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ฉีดให้กระต่ายขาวทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) และได้ผิวหนัง (intradermal injection) อีก 2 แห่งในอัตราประมาณ 5 มิลลิกรัม/ตัว ฉีดซ้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีก 3 ครั้ง หลังจากฉีดครั้งที่ 4 เจาะเลือดจากใบหูกระต่ายทิ้งให้แห้งตัว นำมาปั่นแยกซีรัมออกที่ 3000 g เป็นเวลา 30 นาที

3.2 การทำให้บริสุทธิ์ rabbit anti-YHV antibody นำ serum มาตกตะกอนด้วย 40 % saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 4°C ปั่นที่ 3,000 g แยกตะกอนออกและนำไป dialyzed และละลายใน PBS จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Protein A column ผสมแอนติซีรัมกับ binding buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 ผ่าน protein A column ล้างด้วย binding buffer และเก็บแอนติบอดีโดยใช้ elution buffer จากนั้นนำไป dialyzed ด้วยน้ำกลั่นและทำให้เข้มข้นด้วย vacuum concentrator (Savant)

เติม 5X PBS ในอัตราส่วน 5 : 1 ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดย Bradford reagent แบ่งเป็นส่วน ๆ เก็บไว้ที่ -70°C

3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความจำเพาะของ rabbit anti YHV antibody ตรวจ สอบความบริสุทธิ์ของ rabbit anti YHV antibody ที่ทำให้บริสุทธิ์โดย ammonium sulfate และ protein A column โดย SDS-PAGE ตรวจสอบความจำเพาะของ rabbit anti YHV antiserum โดย Western blot ของ haemolymph จากกิ้งที่ติดเชื้อและ YHV ที่แยกจาก haemolymph เปรียบเทียบกับ monoclonal antibodies V3-2B, Y18 และ Y19 ซึ่งจำเพาะต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัส YHV และ immunohistochemistry

4. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry

นำ haemolymph จากกิ้งที่ติดเชื้อและกิ้งปกติมาแยกด้วยกระบวนการ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) นำตัวอย่างในเจลส่วนหนึ่งไปย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 ตัวอย่างในเจลอีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ Transblot Cell (BioRad) จากนั้นนำไปบ่มใน rabbit anti-YHV antiserum ที่เจือจางใน 5 % blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ 37°C ล้างใน 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมงใน goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP-Biorad) เจือจาง 1 : 1,000 (ใน 5 % blotto, 40 % haemolymph ของกิ้งปกติ) หลังจากล้าง 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปทำปฏิกิริยาในสารละลาย 0.03 % diaminobenzidine, 0.006 % hydrogen peroxide (H_2O_2), 0.05 % cobalt chloride ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

สำหรับการประมาณตำแหน่งของแถบโปรตีนของไวรัสทำโดยเทียบกับ prestained standard protein และนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสนั้นไปบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ haemocyanin (PMVS-22) (Longyant et al., 2000) และใส่สารละลายสับสเตรทที่ไม่มี cobalt chloride

ส่วนการตรวจทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้โดยวิธี immunohistochemistry ทำโดยนำเนื้อเยื่อที่เตรียมใน paraffin section มาละลายพาราฟินออก หยดด้วย P_1^{+} (10 % calf

bovine serum เจือจางใน PBS) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยดด้วย P_1^+ , rabbit anti-YHV antiserum และย้อมด้วย GAR-HRP ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin แล้วทำเป็นสไลด์ถาวร

5. การเตรียม ascites fluid ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

เลี้ยง hybridoma clone V3-2B นำมา reclone เพื่อคัดเลือกโคลนที่สร้างแอนติบอดี ขยายเซลล์จนมีจำนวนประมาณ 50 ล้านเซลล์ บั่นแยกเซลล์นำไปฉีดให้หนูขาวที่ฉีด pristane (0.5 มิลลิลิตร/ตัว) ล่วงหน้าอย่างน้อย 2 สัปดาห์ในปริมาณ 5 ล้านเซลล์/ตัวทิ้งไว้ประมาณ 10-15 วัน ตรวจเช็คการเจริญของ hybridoma เลือกหนูที่มีการเจริญของ ascites tumor เต็มที่มาเจาะ ascites fluid จากช่องท้องออกรวบรวม บั่นแยกเซลล์ออกที่ 3,000 g ทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์โดยนำมาตกตะกอนด้วย 40 % saturated $(NH_4)_2SO_4$ ที่ 4 °C และนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยผ่าน Protein A column จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดย Western blot และ immunohistochemistry

6. การเตรียม V3-2B antibody colloidal gold conjugate

เตรียม 1 % gold chloride ทำโดยนำ gold chloride มาต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที จนได้สารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติม 1 % sodium citrate ต้มต่อไปอีก 10 นาทีจนได้สารละลายมีสีม่วงแดง ทิ้งให้เย็น จากนั้นผสมแอนติบอดี V3-2B ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เติม 10 % BSA ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้เข้มข้นโดยการปั่นที่ 50,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตะกอนของแอนติบอดี V3-2B colloidal gold conjugate ที่ได้ไปใช้ต่อไป

7. การประกอบชุดทดสอบ

7.1 การเตรียม absorbing pad และ colloidal gold conjugate antibody

นำแอนติบอดี V3-2B colloidal gold conjugate ที่ได้จากข้อ 6 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นพ่นลงบนแผ่น sample pad ปริมาณ 2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

7.2 การเตรียม nitrocellulose strip

นำ rabbit anti-YHV antibody ที่ได้จากข้อ 3 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาขีดบน nitrocellulose membrane บริเวณ test line (T) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ส่วนอีกด้านหนึ่งขีดด้วย goat anti mouse IgG antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร บริเวณ control line (C) ทิ้งไว้ให้แห้ง (รูปที่ 4)

7.3 การประกอบชุดทดสอบ

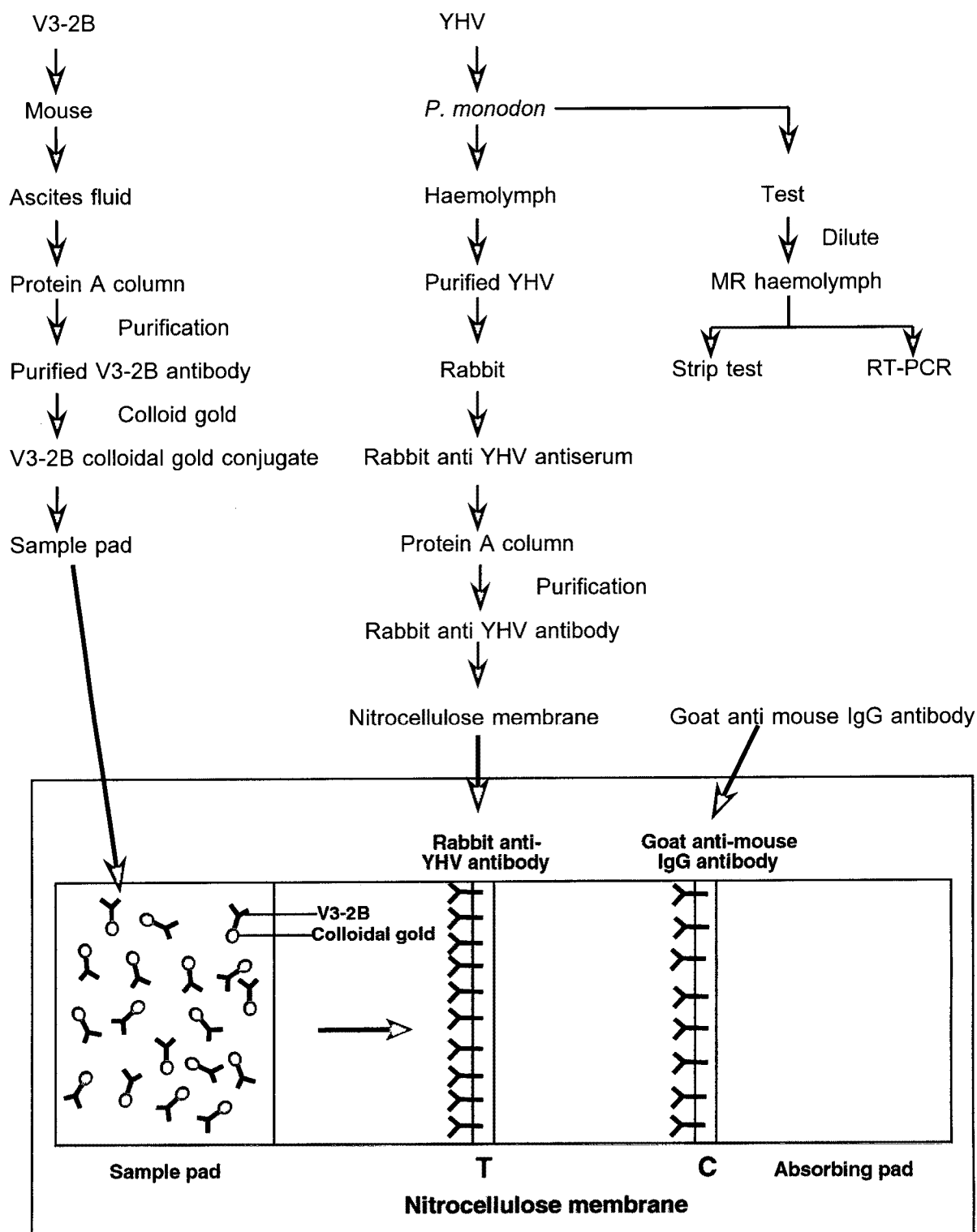
นำแผ่น sample pad ที่ได้จากข้อ 7.1 และแผ่น nitrocellulose membrane จากข้อ 7.2 มาประกอบกันโดยวางแผ่น sample pad ของ V3-2B colloidal gold conjugate ไว้บนด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane ถัดจากบริเวณที่ขีดด้วย rabbit anti-YHV antibody ส่วนด้านตรงข้ามวาง absorbing pad สำหรับดูดซับสารละลายที่ใช้ทดสอบโดยวางถัดจากบริเวณที่ขีดด้วย goat anti-mouse IgG antibody (รูปที่ 4) จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้น ๆ ขนาด 3.5 X 60 มิลลิเมตรแล้วนำมาประกอบใส่ตลับ (รูปที่ 8)

8. การตรวจสอบความไวของ strip test

นำ haemolymph ของกิ้งกูดล่าที่ติดเชื้อ YHV มาเจือจางระดับต่าง ๆ โดยใช้ haemolymph ของกิ้งก่ามกรามเป็นตัว diluent หยดตัวอย่างที่ได้ปริมาณ 200 ไมโครลิตรลงในช่องวงรีของชุดทดสอบ ทิ้งไว้ประมาณ 1-5 นาทีจึงนำมาตรวจผลโดยดูจากแถบสีม่วงแดงที่ปรากฏขึ้นในช่องแสดงผล ถ้าพบว่าปรากฏแถบสีม่วงแดง 2 แถบตรงกับตัวอักษร C และ T แสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าพบว่าปรากฏสีม่วงแดงแถบเดียวตรงกับตัวอักษร C แสดงว่าให้ผลเป็นลบหรือมีการติดเชื้อ YHV ต่ำกว่าชุดทดสอบจะสามารถตรวจสอบได้

9. การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR

นำ haemolymph ของกิ้งกูดล่าที่ติดเชื้อ YHV มาเจือจางระดับต่าง ๆ โดยใช้ haemolymph ของกิ้งก่ามกรามเป็นตัว diluent นำตัวอย่างปริมาณ 200 ไมโครลิตรมาสกัดกรดนิวคลีอิกของไวรัสโดยใช้ชุดสำเร็จรูป (Roche Molecular Biochemicals) นำกรดนิวคลีอิกที่ได้ไปทำ RT-PCR โดยใช้ SuperScript one step RT-PCR system (GIBCO BRL) โดยใช้ไพรเมอร์ YHV10F (CCGCTAATTTCAAAACTA CG) และไพรเมอร์ YHV144R (AAGGTGTTATGTCTG AGGAAG) (Wongteerasupaya et al., 1997) PCR-product ที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วย 2 % agarose electrophoresis โดยผ่านกระแสไฟฟ้า 100 Volt ประมาณ 1 ชั่วโมงใน Tris-borate-EDTA (TBE) buffer และย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งจะให้ผลผลิตขนาด 135 bp



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงสรุปการทดลอง

ผลการทดลอง

1. การเตรียมไวรัส YHV

กึ่งกลาดำประมาณ 120 ตัวนำมาเก็บ haemolymph ได้ 150 มิลลิลิตร นำมาแยกไวรัสได้ประมาณ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำตัวอย่างมาแยกด้วย SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie blue พบแถบโปรตีนหลักของไวรัสที่ 116 64 และ 20 kD โดยมีแถบโปรตีนขนาด 170 kD ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีปะปนมาเล็กน้อย ความบริสุทธิ์ของไวรัสมากกว่า 90 % (รูปที่ 5C)

2. การเตรียม rabbit anti YHV antiserum

จากการฉีด YHV ให้กระต่ายจำนวน 4 ตัว พบว่ากระต่ายทุกตัวมีการตอบสนองและสร้างแอนติบอดีต่อ YHV ครบทุกส่วนคือต่อโปรตีนขนาด 116 64 และ 20 kD ซึ่งเมื่อทดสอบด้วย haemolymph-SRBC conjugate แล้วไม่พบ cross reactivity กับโปรตีนอื่น ๆ ใน haemolymph จากกึ่งปกติและ haemolymph จากกึ่งปกติและ haemolymph จากกึ่งที่ติดเชื้อ (รูปที่ 5B) และเมื่อทดสอบโดยวิธี immunohistochemistry พบว่า rabbit anti YHV antiserum ที่ได้สามารถย้อมเนื้อเยื่อของกึ่งบริเวณที่ติดเชื้อ YHV ได้ (รูปที่ 6) สามารถเก็บ serum ของกระต่ายได้ประมาณ 100 มิลลิลิตรและทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ประมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรได้จำนวน 5 มิลลิลิตร

3. การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B จาก ascites fluid

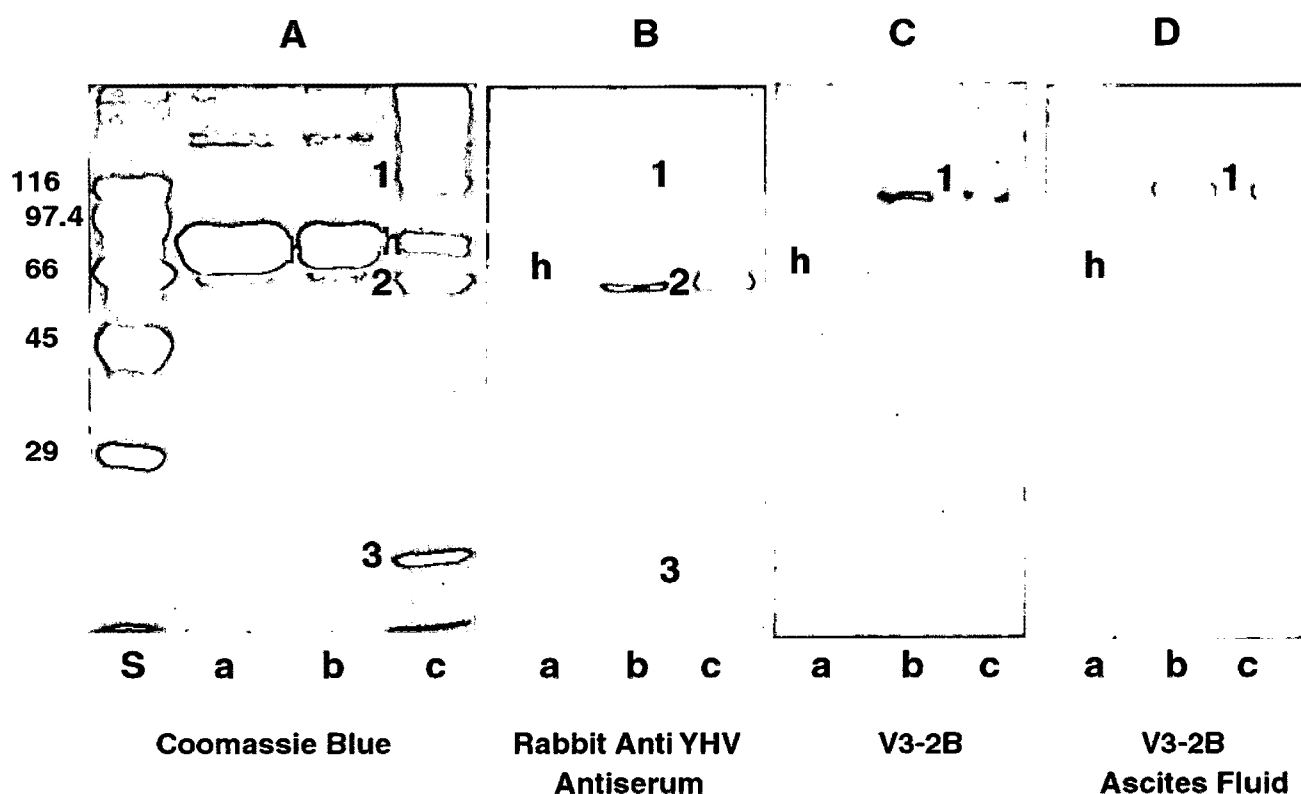
Ascites fluid รวบรวมจากหนูจำนวน 8 ตัวได้ประมาณ 40 มิลลิลิตร หลังจากผ่าน protein A column แล้วได้แอนติบอดี V3-2B ความเข้มข้น 10.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประมาณ 4 มิลลิลิตร เมื่อแบ่งมาทดสอบความจำเพาะโดย Western blot และ immunohistochemistry ที่ความเข้มข้น 1 : 50,000 พบว่ามีความจำเพาะคงเดิม (รูปที่ 5D)

4. การเตรียม V3-2B antibody เชื่อมต่อกับ colloidal gold

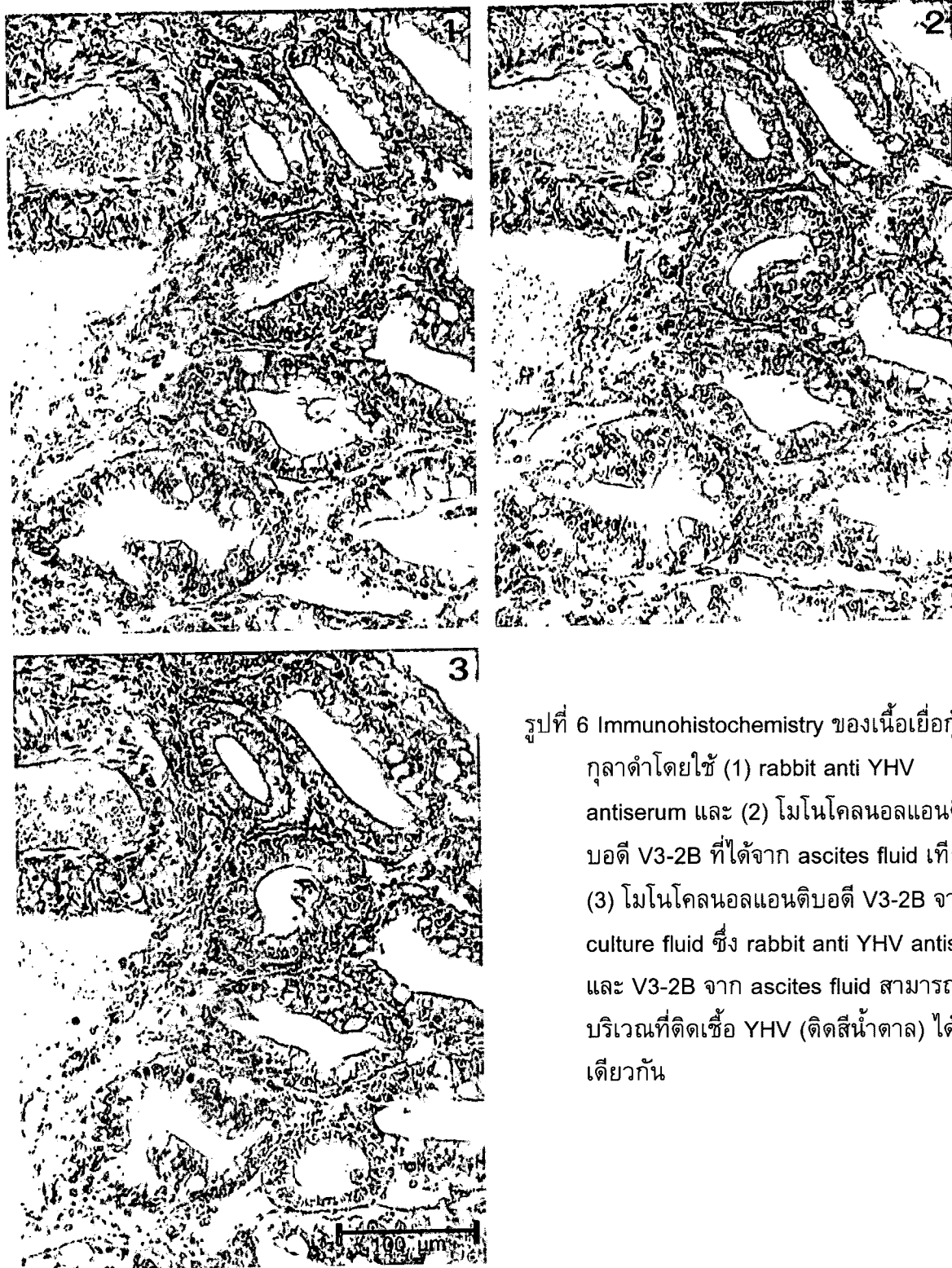
ใช้ V3-2B antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 3 มิลลิลิตร นำมาเชื่อมต่อกับ colloidal gold หลังจากทำให้เข้มข้นแล้ว สามารถนำมาผลิต strip test ได้จำนวน 1,400 ชุด

5. การทดสอบความไวของการตรวจหา YHV โดย strip test

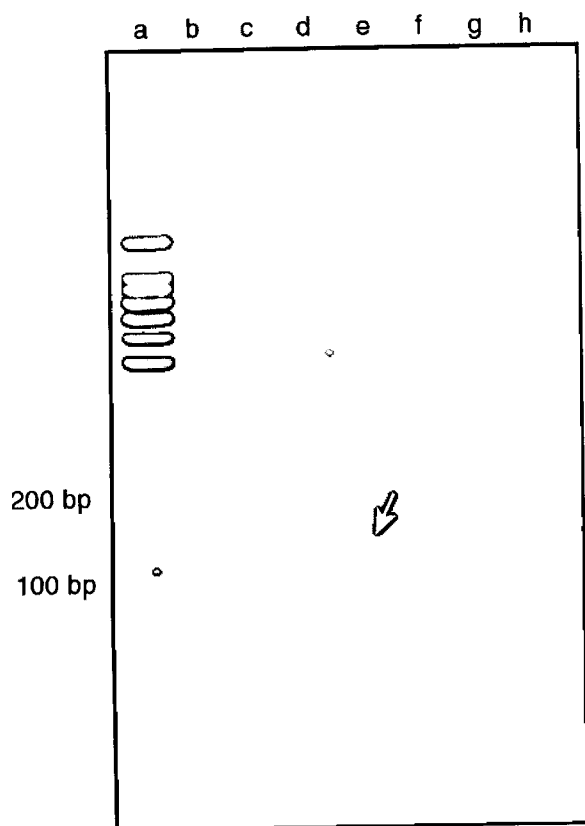
จากการเจือจาง haemolymph ของกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV ด้วย haemolymph



รูปที่ 5 SDS-PAGE (A) และ Western blot (B-E) ของ haemolymph และ YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก กุ้งกุลาดำ ตัวเลขด้านซ้ายมือเป็นน้ำหนักโมเลกุล (kD) ของโปรตีนมาตรฐาน (A) เจลที่ย้อม ด้วย Coomassie blue Western blot ที่ย้อมด้วย rabbit anti YHV antiserum (B) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B (C) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ที่ได้จาก ascites fluid (D) s = โปรตีนมาตรฐาน a = haemolymph ของกุ้งกุลาดำปกติ b = haemolymph ของ กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV c = YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน 1, 2, 3 = โปรตีนหน่วยย่อยของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 116, 64 และ 20 kD ตามลำดับ h = haemocyanin Rabbit anti YHV antiserum มีความจำเพาะต่อ YHV สูงดังผลการตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยแอนติซีรัมสามารถจับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 116 64 และ 20 kD ได้โดยมี background staining เล็กน้อย



รูปที่ 6 Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อถุง
 กุลาดำโดยใช้ (1) rabbit anti YHV
 antiserum และ (2) โมโนโคลนอลแอนติ-
 บอดี V3-2B ที่ได้จาก ascites fluid เทียบกับ
 (3) โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B จาก
 culture fluid ซึ่ง rabbit anti YHV antiserum
 และ V3-2B จาก ascites fluid สามารถย้อม
 บริเวณที่ติดเชื้อ YHV (ติดสีน้ำตาล) ได้ดีเช่น
 เดียวกัน



รูปที่ 7 RT-PCR (a) DNA marker (100 bp ladder) haemolymph ของกิ้งกูดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย haemolymph ของกิ้งก้ามกรามปกติคือ (b) $1 : 2.5 \times 10^4$ (c) $1 : 1 \times 10^5$ (d) $1 : 5 \times 10^5$ (e) $1 : 1 \times 10^6$ (f) $1 : 2.5 \times 10^6$ (g) $1 : 5 \times 10^6$ ตามลำดับ และ (h) haemolymph ของกิ้งก้ามกรามปกติ PCR product ที่ 135 bp ลดลงจนเห็นเพียงเล็กน้อยที่ระดับเจือจาง $1 : 1,000,000$ เท่า (ลูกศร)

สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจไวรัส YHV แบบ strip test โดยใช้ rabbit anti YHV antibody เป็น capture antibody และ goat anti mouse IgG antibody เป็น positive control ขีดบน nitrocellulose membrane และใช้ V3-2B antibody colloidal gold conjugate เป็น detector antibody สะสมบน sample pad วางบนด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane และด้านตรงข้ามวาง absorbing pad สำหรับดูดซับสารละลายที่ใช้ทดสอบวิธีการใช้แสดงดังรูปที่ 8

ชุดตรวจสอบ YHV นี้สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่าง haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV เจือจางได้ถึง 1 : 5,000 เท่าโดยไม่ให้แถบสีชัดเจน ในขณะที่การตรวจสอบแบบ indirect immunoperoxidase sandwich ELISA ให้ผลบวกชัดเจนที่ 1 : 200,000 เท่าและ one step RT-PCR ให้ผลตรวจได้ 1 : 1,000,000 เท่า (ไพศาลและคณะ 2546) ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความไวต่ำกว่าวิธีทั้งสอง 40 และ 200 เท่าตามลำดับ ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะมีมีความไวต่ำกว่าทั้งสองวิธีแต่ก็มีข้อได้เปรียบหลายประการได้แก่ 1) สามารถทำการทดสอบได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใด ๆ เพิ่มเติมจากอุปกรณ์จะเก็บ haemolymph หรือบดเตรียมเนื้อเยื่อเหมือนวิธีการทดสอบวิธีอื่น ๆ จึงสามารถใช้ในภาคสนามได้อย่างสะดวก 2) สามารถทำได้โดยเกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปที่ไม่จำเป็นต้องมีความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ 3) ผลการทดสอบสามารถทราบผลได้ทันทีภายในระยะเวลา 1 นาที (รูปที่ 8) 4) ราคาไม่แพงนักประมาณ 100-200 บาทต่อชุดทดสอบ 5) การเก็บรักษาง่ายเพราะบรรจุในถุงปราศจากความชื้นเพียงเก็บไว้ในตู้เย็นปกติสามารถใช้ได้เป็นเวลานานหลายปี แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อเสียในแง่ความไวของชุดทดสอบแล้วยังมีข้อควรระวังในการทดสอบ คือการเก็บเลือดควรเจือจางเลือดด้วย anti coagglulant ประมาณ 3 เท่าขึ้นไปและใช้ทดสอบและตรวจดูผลทันทีไม่ควรทิ้งไว้นานเพราะอาจเกิดการจับของสารสีในเลือดกับ capture antibody ได้ทำให้เกิด false positive และในกรณีที่มีการติดเชื้อระดับต่ำมาก ๆ อาจตรวจไม่พบ ดังนั้นกรณีที่ได้ผลลบจากชุดตรวจนี้ควรตรวจซ้ำด้วยวิธี RT-PCR เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งนั้นปลอดเชื้อ YHV แน่นอน ชุดตรวจนี้จึงควรใช้ในการยืนยันผลการติดเชื้อเบื้องต้นขั้นแรกเท่านั้น

อนึ่งเนื่องจาก V3-2B เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ YHV สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงในประเทศไทยเท่านั้น การใช้ตรวจเชื้อคล้าย YHV สายพันธุ์อื่นได้แก่ gill associated virus (GAV) หรือสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคในประเทศไทยไม่สามารถใช้ได้ สำหรับชุดตรวจที่ใช้ตรวจเชื้อ 2 สายพันธุ์ดังกล่าวกำลังอยู่ในระหว่างการพัฒนา

สำหรับชุดตรวจนี้คณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการปรับปรุงเพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะให้ดีขึ้นกว่าเดิม ซึ่งคาดว่าจะสามารถได้ชุดตรวจซึ่งสามารถใช้ตรวจได้อย่างแม่นยำและมีความไวสูงขึ้น

การพัฒนาชุดตรวจรูปแบบอื่น ๆ ได้แก่ sandwich dip strip โดยใช้ immunoperoxidase เป็นตัวเพิ่มสัญญาณคล้าย indirect immunoperoxidase ELISA แต่ให้ใช้สะดวกมากขึ้นคาดว่าจะสามารถเพิ่มความไวของชุดตรวจได้ใกล้เคียงกับ RT-PCR ได้เช่นกัน

ชุดทดสอบไวรัสโรคหัวเหลืองแบบแถบสี (Strip test)

อุปกรณ์ประกอบด้วย

- เข็มฉีดยาสำหรับเจาะเลือด (syringe)
- สารเก็บตัวอย่าง
- ดลับทดสอบ (strip test)

ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ

1) แบ่งสารเก็บตัวอย่างประมาณ 0.5 มล. ลงในหลอดที่เตรียมไว้ 2) ใช้กรรไกรตัดส่วนของเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจ เช่น ส่วนปลายของขาคู่แรก, เหนืออก, เนื้อเยื่อใต้เปลือกส่วนหัวและกล้ามเนื้อ ใช้ปากคีบ คีบเนื้อเยื่อลงในหลอดที่เตรียมไว้ 3) บดเนื้อเยื่อในหลอดให้ละเอียดพอสมควร 4)ปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 rpm, 1-2 นาที 5) ดูดส่วนที่เป็น น้ำใสออกมา 0.1-0.2 มล. หยดลงในช่องวงรี (5) บนชุดแถบทดสอบ 6) ทิ้งไว้ประมาณ 1-5 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ (ไม่ควรอ่านผลหลังจากทิ้งไว้นานกว่า 15 นาที)

ตัวอย่างจากเลือดกุ้ง

1) ใช้เข็มฉีดยาดูดสารเก็บตัวอย่างในหลอดที่เตรียมไว้ประมาณ 0.2 มล. 2) ดูดเลือดกุ้งจากแอ่งเลือดบริเวณใต้ท้องหรือหัวใจประมาณ 0.1 มล. 3) ผสมสารเก็บตัวอย่างและเลือดกุ้งให้เข้ากัน โดยการดันก้านกระบอกฉีด ขึ้นลงหรือตีเบา ๆ 4) หยดเลือดกุ้งที่ผสมสารเก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ประมาณ 0.1-0.2 มล. ลงในช่องวงรี (5) บนชุดแถบทดสอบ 5) ทิ้งไว้ประมาณ 1-5 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ (ไม่ควรอ่านผลหลังจากทิ้งไว้นานกว่า 15 นาที)

การอ่านผล

โดยดูแถบสีชมพูที่ปรากฏขึ้นในช่องแสดงผลของชุดแถบทดสอบ ถ้าพบว่าปรากฏแถบสีชมพู/ม่วง 2 แถบตรงกับตัวอักษร C (control) และ T (test) แสดงว่ากุ้งที่นำมาทำการทดสอบติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ถ้าพบว่าปรากฏสีชมพู/ม่วงแถบเดียวตรงกับตัวอักษร C (control) แสดงว่ากุ้งที่นำมาทดสอบไม่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองหรือติดเชื้อในระดับที่ต่ำกว่าความสามารถของแถบทดสอบที่จะตรวจจับได้

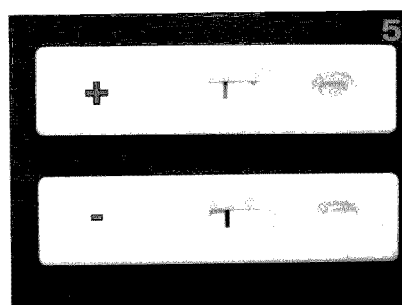
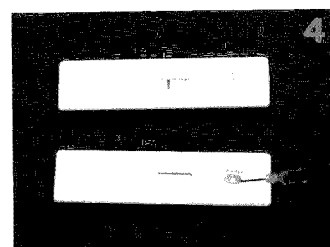
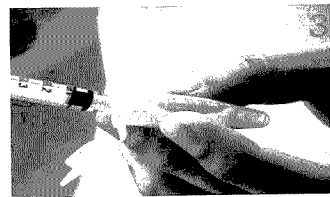
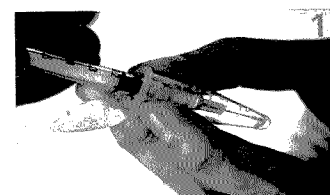
ข้อควรระวัง

1) อุปกรณ์ทุกชนิดที่นำมาใช้ควรเป็นอุปกรณ์ที่สะอาด ผ่านการฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C, ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาทีก่อนใช้ทุกครั้ง

2) ชุดตรวจภาคสนามนี้เหมาะสำหรับการวินิจฉัยโรคหัวเหลืองเบื้องต้นเท่านั้น หลังจากตรวจหากพบว่าได้ผลเป็นลบ ควรตรวจซ้ำด้วยวิธีการทาง RT-PCR หรือตรวจดูความผิดปกติของเนื้อเยื่อ (histology) เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

ประดิษฐ์โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล } ภาควิชาชีววิทยา
ดร. ศิวพร ลงยันต์ } มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
คุณสมบัติ รักประทานพร หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล BIOTEC
คุณนิลวรรณ เพชรบูรณ์ Pacific Biotech Co., LTD.
**สนับสนุนทุนวิจัยโดยฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



รูปที่ 8 ขั้นตอนการใช้ชุดตรวจสอบไวรัสโรคหัวเหลืองแบบแถบสี

เอกสารอ้างอิง

- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543 กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ : เจริญรัตน์การพิมพ์.
- ไพศาล สิทธิกรกุล และคณะ. 2546. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีความไวและความแม่นยำสูงโดยวิธี Sandwich ELISA รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2545. 36 หน้า
- สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535. Baculovirus สาเหตุโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง ระหว่างวันที่ 16-19 กันยายน 2535 ณ ห้องประชุม สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. กรุงเทพฯ : 200-205.
- Anil, T.M., Shankar, K.M. and Mohan. C.V. 2002. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. Dis. Aquat. Org. 51 : 67-68.
- Boonyaratpalin, S., Supamataya, K., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U. and Chantanachookin, C. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Pathol. 28 (3) : 103-109.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.
- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S. and Flegel, T. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. Dis. Aquat Org. 17 : 145-157.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. and Walker, P.J. 2000. Gill-Associated virus of *Penaeus monodon* prawns : An invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen Virol. 81 : 1473-1484.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Wongteerasuoaya, C., Boonsaeng, V. Panyim, S. and Walker, P.J. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. Dis. Aquat. Org. 36 : 153-157.
- Flegel, T. and Sriurairatana, S. 1993. Black tiger prawn diseases in Thailand. Page 6 in D.M. Akiyama, editor. Technical Bulletin AQ39 1993/3, American Soybean Association, Singapore 0923.

- Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds), Diseases in Aquaculture III., Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. p 285-302.
- Javois, L.C. 1999. Immunocytochemical methods and protocols. Methods in molecular biology. V115 2nd ed. 465p.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P., Panyim, D. and Boonsaeng, V. 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84 : 863-873.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680-685.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnosis methods. Aquacultures. 164 : 201-220.
- Loh, P.C., Tapay, L.M., LU, Y. and Nadala, E.C.B. Jr. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. Advances in Virus Research .48 : 263-311.
- Longyant, S., Sithigorngul, P., Thampalerd., N., Sithigorngul., W., and Menasveta. P. 2000. Characterization of vitellin and vitellogenin of giant tiger prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. Invert. Reprod. Dev. 37(3) : 211-221.
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, J.A. and Loh, P.C. 1994. Infection of the yellow head baculo-likevirus (YHB) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J. Fish. Dis. 17: 649-656
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, Loh, P.C. and Brock, J.A. 1995. Distribution of yellow head virus in selected tissue. Dis. Aquat. Org. 23 : 67-70.
- Lui, W., Wang, Y.T., Tian, D.S. Yin, Z.C. and Kwang, J. 2002. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelop protein (28 kDa). Dis. Aquat. Org. 49 : 11-18.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M., Cao, S. and Loh, P.C. 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. J. Virol. Meth. 69 : 39-44.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M. and Loh, P.C. 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. Dis.Aquat.Org. 31 : 141-146.

- Nadala Jr., E.C.B. and Loh, P.C. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp. *J. of Virol. Meth.* 175-179.
- Poulos, B.T., Kibler, R., Bradley-Dunlop, D., Mohnney, L.L. and Lightner, D.V. 1999. Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 37 : 99-106.
- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aquilar, J. and Lightner, D.V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 47 : 13-23.
- Rodriguez J., Boulo, V., Mialhe, E. and Bachere E. 1995. Characterisation of shrimp haemocyte and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell. Science.* 108 : 1043-1050.
- Sithigorngul, P., Chauychuwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42 : 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49 : 71-76.
- Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Panyim, S., Cowley, J.A., Jittrapakdee, S., Boonsaeng, V. and Walker P.J. 2002. The complete ORF1b-gene sequence indicates yellow-head virus is an invertebrate nidovirus. *Dis. Aquat. Org.* 50 : 87-93.
- Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 1998. A yellow-head virus probe : application to in situ hybridization and determination of its nucleotide sequence. *Dis. Aquat. Org.* 35 : 165-173.
- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Anutara, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.* 22 : 45-50.
- Wongteerasupaya, C., Thongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) for *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31 : 181-186.