

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae
โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี และวิธีพีซีอาร์

ปริญญานิพนธ์

ของ

ฝน ต้นสกุล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2550

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae
โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี และวิธีพีซีอาร์

ปริญญานิพนธ์

ของ

ฝน ต้นสกุล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2550

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae
โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี และวิธีพีซีอาร์

บทคัดย่อ
ของ
ฝน ต้นสกุล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
พฤษภาคม 2550

ฝน ตันสกุล. (2550). การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ *Palaemonidae* และ *Atyidae* โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี และวิธีพีซีอาร์. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. กรุงเทพฯ :
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ศาสตราจารย์ ดร.
ไพศาล สิทธิกรกุล, อาจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์

ได้ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งจากบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตน้ำเค็ม น้ำกร่อย และน้ำจืด จากจังหวัดชลบุรี สมุทรปราการ และพระนครศรีอยุธยา นำมาตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) โดยวิธี PCR และ immunohistochemistry เพื่อตรวจการติดเชื้อตามธรรมชาติและชักนำให้ติดเชื้อโดยให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติ และจากการชักนำให้ติดเชื้อโดยให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหรือการฉีด haemolymph จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติและจากการชักนำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธีการกินในกุ้งทั้ง 2 วงศ์ คือวงศ์ *Palaemonidae* และ *Atyidae* สำหรับการชักนำโดยการฉีดและตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี PCR พบการติดเชื้อระดับต่างๆ ในกุ้งวงศ์ *Palaemonidae* ทั้ง 3 ชนิดคือ กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* กุ้งฝอยน้ำจืด *Macrobrachium lanchesteri* และกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* การตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry เพื่อยืนยันผล พบว่ากุ้งฝอยน้ำเค็ม (52/150) มีการติดเชื้อที่รุนแรงในปริมาณมาก ขณะที่กุ้งฝอยน้ำจืด (15/159) และกุ้งก้ามกราม (5/172) มีการติดเชื้อในปริมาณน้อย ขณะที่กุ้งวงศ์ *Atyidae* คือ กุ้งกะปิ *Caridina* sp. ไม่สามารถทดลองการติดเชื้อโดยวิธีการฉีดได้เนื่องจากมีขนาดเล็ก ดังนั้นกุ้งในวงศ์ *Palaemonidae* โดยเฉพาะกุ้งฝอยน้ำเค็มน่าจะมีศักยภาพในการเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ส่วนกุ้งฝอยน้ำจืดและกุ้งก้ามกรามสามารถติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่อาจมีกลไกในการกำจัดเชื้อไวรัสดังกล่าวทำให้มีความสามารถในการต้านทานต่อไวรัสชนิดนี้ได้

Detection of White Spot Syndrome Virus in Palaemonidae and Atyidae by Shrimps by
Immunohistochemistry and PCR techniques

AN ABSTRACT
BY
FON TUNSAKUL

Present in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Education degree of Biology
at Srinakharinwirot University
May 2007

Fon Tunsakul. (2007). *Detection of White Spot Syndrome Virus in Palaemonidae and Atyidae by Shrimps by Immunohistochemistry and PCR techniques*. Master thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul, Dr. Siwaporn Longyant

Palaemonid shrimps including *Palaemon serrifer*, *Macrobrachium lanchesteri*, *Macrobrachium rosenbergii* and Atyidae shrimp *Caridina* sp. Were collected from freshwater and brackish water at Chonburi, Samutprakarn and Phranakornsriyuttaya provinces and detected for natural and experimental infection of WSSV using immunohistochemistry and PCR techniques. No WSSV immunoreactivity was observed in all species of naturally collected shrimps and experimentally infected shrimps fed with muscle of WSSV – infected *Penaeus monodon*. In case of shrimps, injected with WSSV-infected haemolymph of *P. monodon*, different levels of infection were found by PCR among 3 species of Palaemonid shrimps. The results were confirmed by immunohistochemistry for WSSV infection. *P. serrifer* was heavily infected (52/150) whereas *M. lanchesteri* and *M. rosenbergii* demonstrated mild infection (15/159) and (5/172), respectively. The WSSV experimental infection by injection of WSSV-infected haemolymph of *P. monodon* could not be performed in *Caridina* sp. due to size limitation. The result of this experiment revealed that Palaemonid shrimps, *P. serrifer*, could be the potential carrier of WSSV. *M. lanchesteri* and *M. rosenbergii* can be infected by WSSV but the different levels of WSSV resistance were demonstrated.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง Palaemonidae และ Atyidae

โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี และวิธีพีซีอาร์

ของ

ฝน ต้นสกุล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คนบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศิริ จีระเดชากุล)

วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2550

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

.....ประธาน

(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

(รองศาสตราจารย์ ทรรศนียา ศักดิ์ดี)

.....กรรมการ

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

(ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ในการปฏิบัติงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ทรรศเนียา ศักดิ์ดี ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการการสอบปริญญานิพนธ์ และ ดร. นันทิกา คงเจริญพร สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นกรรมการการสอบปริญญานิพนธ์และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในเชิงวิชาการมากขึ้น

ขอขอบคุณ คุณสมบัติ รักประธานพร คุณธนวรรณ เตชะกกุล ที่ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณภิรมย์ศักดิ์ พัฒนไพจิตรกุล คุณเพ็ญจันทร์ โพธิ์ย้อย คุณรัตนา จิตรขำ คุณอภิรักษ์ ต้นศิริสิทธิกุล และทุกคนในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดีของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับน้ำใจอันมีค่ายิ่ง อีกทั้งความช่วยเหลือต่างๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับทั้งทางตรงและทางอ้อม

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา และน้องๆทุกคนที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือสนับสนุนตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอโน้มนำประโยชน์ทั้งหลายอันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ผู้คนที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ฝน ต้นสกุล

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	5
ความสำคัญของการวิจัย.....	5
ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	6
สมมติฐานการวิจัย.....	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
สัตว์ทดลอง.....	22
วิธีดำเนินการทดลอง.....	25
4 ผลการทดลอง.....	41
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	61
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก.....	73
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	92

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงอุณหภูมิระยะเวลาและจำนวนรอบในแต่ละขั้นการทำงาน ของปฏิกิริยา PCR.....	30
2 แสดงชนิดสัตว์ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ และนำมาชักนำให้กุ้งติดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาวโดยการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่างๆ	47
3 แสดงชนิดสัตว์ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ และนำมาชักนำให้กุ้งติดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติด เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบ ที่ระยะเวลาต่างๆ	48
4 สรุปศักยภาพในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae.....	64

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งชนิดต่างๆ	27
2 ขั้นตอนการสกัด DNA.....	29
3 แสดงตัวอย่างผลของ agarose gel electrophoresis.....	32
4 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่งในการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว.....	34
5 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology.....	36
6 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อกุ้งโดย วิธีอินไดเรคติมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method).....	38
7 สรุปแนววิธีทดลอง.....	39
8 ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (<i>Palaemon serrifer</i>)	43
9 ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำจืด (<i>Macrobracium lanchesteri</i>)	43
10 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม (<i>Macrobracium rosenbergii</i>).....	44
11 ลักษณะของกุ้งกะปิ (<i>Caridina</i> sp.)	44
12 แสดงผลการทำ PCR ของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (<i>Palaemon serrifer</i>)	49
13 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก ของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (<i>Palaemon serrifer</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry.....	50
14 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณ เยื่อผิวหนังได้เปลือกของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (<i>Palaemon serrifer</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 10 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี Immunohistochemistry.....	51
15 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (<i>Palaemon serrifer</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29).....	52
16 แสดงผลการทำ PCR ของกุ้งฝอยน้ำจืด (<i>Macrobracium lanchesteri</i>)	53

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

17 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก ของกุ้งฝอยน้ำจืด (<i>Macrobracium lanchesteri</i>) ที่ฉีดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry.....	54
18 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของกุ้งฝอยน้ำจืด (<i>Macrobracium lanchesteri</i>) ที่ฉีดเชื้อ ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29)	55
19 แสดงผลการทำ PCR ของกุ้งก้ามกราม (<i>Macrobracium rosenbergii</i>).....	56
20 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก ของกุ้งก้ามกราม (<i>Macrobracium rosenbergii</i>) ที่ฉีดเชื้อ ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วันและตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry	57
21 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณตับ ของกุ้งก้ามกราม (<i>Macrobracium rosenbergii</i>) ที่ฉีดเชื้อ ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry	58
22 แสดงผลการทำ PCR ของกุ้งกะปิ (<i>Caridina</i> sp.).....	59
23 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ ของกุ้งกะปิ (<i>Caridina</i> sp.) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29)	60

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ประเทศไทยเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งกุลาดำเป็นอันดับหนึ่งของโลกในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา โดยมีผลผลิตส่งออกได้ถึงปีละ 250,000 ตัน มูลค่าการส่งออกล่าสุดในปี 2543 จำนวน 100,000 ล้านบาท โดยปริมาณการส่งออกคิดเป็น 95% ของผลผลิตรวม ส่วนอีก 5% เป็นการบริโภคภายในประเทศ (สิริ ทุกชีวินาศ; และชุติมา ชมวิทย์. 2545: ออนไลน์) กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเพื่อส่งออกนั้นต้องเป็นไปตามมาตรฐานข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้าให้เป็นไปตามสากล สำหรับแนวทางผลิตกุ้งคุณภาพของไทย กรมประมงได้ดำเนินการตั้งแต่ปี 2541 โดยได้มีการจัดทำมาตรฐาน Code of Conduct (CoC) เริ่มต้นจากผู้ประกอบการโรงเพาะฟักกุ้ง ฟาร์มเลี้ยง ผู้ผลิต ผู้ค้า บัณฑิตการผลิอาหาร ยา และสารเคมีภัณฑ์ ผู้จัดจำหน่ายกุ้งและผู้แปรรูป ในสายการผลิตได้จัดทำฟาร์มนำร่องสาธิตในภาคตะวันออกที่จังหวัดระยองและจันทบุรี และภาคใต้ที่จังหวัดสงขลา ขณะนี้ได้มีการขยายฟาร์ม CoC ใน 22 จังหวัดชายฝั่งทะเล ในปัจจุบันได้รับการติดต่อจากตลาดใหญ่ๆ ในต่างประเทศ อาทิ จากประเทศฝรั่งเศส อังกฤษ รวมถึงเครือภัตตาคารในสหภาพยุโรป และบริษัทผู้จัดจำหน่ายรายใหญ่ของสหภาพยุโรปจากประเทศอิตาลีและประเทศเยอรมัน นอกจากนี้กรมประมงยังมีการสนับสนุนส่งเสริมการส่งออกโดยจัดให้มีการแนะนำและขยายตลาดรวมถึงการประชาสัมพันธ์กุ้งคุณภาพของไทยไปยังตลาดโลกให้เป็นที่แพร่หลายมากขึ้น

เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งส่วนใหญ่ในประเทศไทยนิยมใช้เทคโนโลยีการเลี้ยงกุ้งระบบปิด ซึ่งเป็นระบบการจัดการเลี้ยงกุ้งที่ไม่ใช้น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติในบ่อเลี้ยงกุ้งโดยตรง ภายหลังจากที่ได้ปล่อยกุ้งลงบ่อแล้วเกษตรกรอาจต้องเติมน้ำลงไปบ่อบ้างเล็กน้อยเพื่อชดเชยการสูญเสียและรักษาระดับน้ำให้อยู่ในระดับเหมาะสมต่อการจัดการ ในปัจจุบันเทคโนโลยีการเลี้ยงกุ้งระบบชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทมากขึ้นโดยเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการจัดการเลี้ยงกุ้งของเกษตรกร นอกจากนี้การนำเทคโนโลยีการตรวจโรค เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้เพื่อป้องกันและคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพดีและปราศจากโรคมาใช้ในการขยายพันธุ์ เทคโนโลยีการตรวจโรคสามารถนำไปใช้กับลูกกุ้งได้เพื่อคัดเลือกลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อก่อนปล่อยลงบ่อเลี้ยง ดังนั้นฟาร์มเลี้ยงกุ้งควรมีการดูแลสุขภาพของกุ้งสม่ำเสมอ เมื่อพบความผิดปกติควรนำตัวอย่างกุ้งไปตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคกุ้ง ประเทศไทยประสบปัญหาในอุตสาหกรรมกา

ของไทยในตลาดโลกได้อย่างมีมาตรฐาน กรมประมงได้ทำการแก้ปัญหาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างเร่งด่วน โดยการจัดทำระบบการจัดการสิ่งแวดล้อมหรือ CoC สำหรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลขึ้น ดังนั้นมาตรฐาน CoC สำหรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเพื่อความยั่งยืนของไทยได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยเป็นการผสมผสานแนวมาตรฐานของกรมประมง ในส่วนของการปรับปรุงรวมถึงระบบการจับและขนส่งที่มีอยู่เดิมซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานสากล เพื่อให้การผลิตและการส่งออกกุ้งของไทยเป็นที่ยอมรับมากขึ้นในสากล

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับกุ้งในด้านต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น งานวิจัยทางด้านอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอาหารสำเร็จรูปสำหรับลูกกุ้ง กุ้งที่เลี้ยง พ่อแม่พันธุ์ ด้านการเพาะเลี้ยงและคุณภาพน้ำเป็นเรื่องที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งตามวิธีการเลี้ยงกุ้งระบบชีวภาพ งานวิจัยเกี่ยวกับสุขภาพและการเกิดโรคในกุ้งเป็นงานวิจัยที่มีความสำคัญที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากข้อมูลที่ได้จะใช้เป็นแนวทางการวินิจฉัยและป้องกันการเกิดโรคกุ้งได้ ข้อมูลขั้นต้น เช่น การสังเกตอาการภายนอกของกุ้ง สีและเปลือกกุ้งสามารถใช้บ่งชี้สุขภาพและความผิดปกติของกุ้งได้ ทางด้านอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลได้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเกี่ยวกับโรคและปรสิตของกุ้งทะเลที่ก่อให้เกิดผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง เช่น โรคที่เกิดจากไวรัสต่างๆ โรคติดเชื้อแบคทีเรีย โรคจากปรสิตชนิดต่างๆ โดยเน้นการศึกษาในแง่การป้องกันโรคและการตรวจสอบด้วยวิธีการจำเพาะต่อโรคแต่ละโรค (วารสารกรมประมง ปีที่ 55 ฉบับที่ 3 พ.ค.-มิ.ย.45)

ปัญหาการระบาดของโรคในกุ้งกุลาดำจัดเป็นปัญหาสำคัญที่สุด เนื่องจากธุรกิจการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นธุรกิจที่ทำรายได้สูงสุด ทั้งนี้สาเหตุการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำส่วนใหญ่มาจากโปรโตซัวแบคทีเรีย เช่น โรคที่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. (Vibriosis) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสง และโรคที่เกิดจากไวรัส ซึ่งได้สร้างความเสียหายอย่างรุนแรงและระบาดอย่างต่อเนื่อง (Flegel; et al. 1995: 65 - 79) ซึ่งโรคที่เกิดจากไวรัส ได้แก่ ไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus) ซึ่งระบาดตั้งแต่ช่วงปลายปี 2533 โดยมีการระบาดครั้งแรกในภาคกลาง (จิราพร เกษรจันทร์; และสิทธิ บุญยรัตผดลิน. 2535) และระบาดไปสู่ภาคตะวันออกและภาคใต้ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น นอกเหนือไปจากไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus: WSSV หรือ Systemic Ectodermal & Mesodermal Baculovirus: SEMBV) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างหนักและกว้างขวางทุกพื้นที่นับตั้งแต่ปี 2537 เป็นต้นมา (ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543: 177)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นไวรัสที่ก่อโรคในกุ้งสกุล *Panaeus* ซึ่งเป็นกุ้งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งอย่างมาก ไวรัสนี้สามารถทำให้กุ้งตายหมดบ่อภายในเวลา 3-10 วัน มี

รายงานการพบโรคนี้ครั้งแรกที่ได้หวั่นในปี 1992 (Chou; et al. 1995: 133 - 141) จากนั้นได้มีการรายงานการระบาดไปทั่วในกลุ่มประเทศที่มีอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง สำหรับประเทศไทยพบการระบาดของไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในในฟาร์มกุ้งกุลาดำที่อำเภอระโนด และอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา รวมถึงอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง (Kasornchandra; & Boonyaratpalin. 1994: 9 - 11) นอกจากนี้ยังพบว่าการแพร่ระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวในจังหวัดสตูล กระบี่ ปัตตานี ภูเก็ต สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช จันทบุรี ระยอง และตราด เป็นต้น (Limsuwan. 1994: 12 - 14, Kasornchandra; & Boonyaratpalin. 1994: 9 - 11) ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถติดต่อกันในกุ้งที่สำคัญทางเศรษฐกิจเกือบทุกชนิด (Lightner. 1996) ไม่ว่าจะเป็นกุ้งทะเลและยังตรวจพบในคริสต์เขียหลายชนิดทั้ง crayfish และปู (Supamattaya; et al. 1998: 79 - 85) ซึ่งสัตว์เหล่านี้สามารถเป็นพาหะนำโรคสู่กุ้งได้ (Kanchanaphum; et al. 1998: 1 - 7)

เนื่องจากไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นโรคที่ยังไม่มีวิธีการรักษา ดังนั้นนักวิชาการได้แนะนำวิธีป้องกันอย่างง่าย ๆ หลายวิธีต่อเกษตรกร ได้แก่ การเตรียมบ่อให้เหมาะสมและถูกสุขลักษณะ ปริมาณกุ้งที่เหมาะสมต่อหนึ่งบ่อเลี้ยง การป้องกันพาหะตามธรรมชาติของโรคตัวแดงดวงขาว เช่น ปูและอาร์โทรพอด รวมทั้งการเลือกชนิดอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งโดยได้แนะนำให้หลีกเลี่ยงอาหารสด เช่น ปูสด ปลาสด หรือหอยสดซึ่งอาจเป็นสัตว์พาหะ นอกจากนี้ นักวิชาการเกษตรยังแนะนำให้เกษตรกรใช้วิธีการเพาะเลี้ยงในระบบเปิดและการทำการตรวจคุณภาพน้ำสม่ำเสมอ (Kasornchandra; & Boonyaratpalin. 1994: 9 - 11, Limsuwan. 1994: 12 - 14) อย่างไรก็ตามกุ้งที่เกษตรกรนำมาเลี้ยงอาจได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีเชื้อนี้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยกึ่งก่อนนำมาเลี้ยงจึงเป็นการป้องกันการเสียหายที่ดีและมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

จากเหตุผลดังกล่าวจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ไวรัสตัวแดงดวงขาวขึ้นหลายวิธี เช่น วิธี Polymerase Chain Reactions (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน (Chang; et al. 1996: 131 - 139; Lightner; & Redmen. 1998: 201 - 220; Kasornchandra; et al. 2000: 32 - 41; Chen; et al. 2000: 157 - 161) วิธี PCR นี้เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรม (Nucleic acid) ของไวรัสโดยตรงจึงมีความไวสูงโดยสามารถตรวจพบการติดเชื้อตั้งแต่ในระยะแรกซึ่งมีจำนวนไวรัสน้อยมาก นอกจากนี้ PCR ใช้เวลาในการตรวจสั้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวินิจฉัยแบบอื่นๆ เช่น การวินิจฉัยจากอาการที่ปรากฏ (Symptomatic diagnosis) และการตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อ (histological examination) (Wongteerasupaya; et al. 1995: 69 - 77; Lightner; & Redman. 1998: 201 - 220; Mohan; et al. 1998: 9 - 12; Park; et al. 1998: 71 - 75) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนอกจากต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์แล้วการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในระยะแรกก็ทำได้ยากเนื่องจากจำนวนไวรัสต่ำ นอกจากนี้อาการของโรคที่ปรากฏอาจมาจากสาเหตุอื่น เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียซึ่งอาจทำ

ให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ แม้การวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR จะเป็นวิธีที่มีความไวสูงในการตรวจวิเคราะห์ แต่ยังมีข้อจำกัดในทางปฏิบัติ ทั้งนี้เนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์พิเศษและบุคคลที่มีความชำนาญ ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ยังมีราคาสูง รวมทั้งไม่สามารถรับรองความแม่นยำและไม่สามารถนำผลมาเทียบเคียงระหว่างห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากวิธีการที่แตกต่างกันอาจให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันได้ซึ่งจะก่อให้เกิดความสับสนในการแปลผล

กระบวนการทางภูมิคุ้มกันวิทยาเป็นวิธีการที่มีความสะดวกและความแม่นยำสูง ดังนั้นวิธีการนี้จึงได้รับความสนใจจากนักวิจัยจำนวนมาก และได้เกิดความพยายามนำกระบวนการทางภูมิคุ้มกันมาใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว (Nadala; et al. 1997: 141 - 146 ; 2000: 175 - 179) แต่วิธีการทางภูมิคุ้มกันนี้มีข้อจำกัด คือ ประสิทธิภาพการใช้งานไม่ดี เนื่องจากแอนติบอดีที่ผลิตได้อาจทำปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนของกุ้งและความไวในการตรวจโรคค่อนข้างต่ำ ในปัจจุบันได้มีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody : MAb) โดยใช้ไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์เป็นแอนติเจนซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถใช้ในการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี dot blot, western blot และตรวจการติดเชื้อในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry และ immunofluorescence ได้ดีแต่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ได้ (Poulos; et al. 2001: 13 - 23; Anil; et al. 2002: 67 - 75)

จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทำให้ทราบข้อมูลยีนต่างๆ ของไวรัส (Van Hulten; et al. 2000a: 227 - 236) และสามารถจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงสร้างของไวรัส 5 ชนิดด้วยกัน คือ VP28 VP26 VP24 VP19 และ VP15 โดย VP26 VP24 และ VP15 เป็นองค์ประกอบของ nucleocapsid ส่วน VP28 และ VP19 เป็นส่วนประกอบของโปรตีนเปลือกนอก (Enveloped protein) (Van Hulten; et al. 2000b: 100 - 110; Van Hulten; et al. 2002: 257 - 265) ข้อมูลดังกล่าวได้นำมาใช้ในการผลิต recombinant protein ขององค์ประกอบส่วนเปลือกของไวรัส ได้แก่ VP28 เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตำแหน่ง (Epitope) ที่ต่างกันซึ่งสามารถใช้เพื่อพัฒนาวิธีการ antigen-capture ELISA สำหรับตรวจไวรัสจากเลือด (Haemolymph) และสารสกัดจากเนื้อเยื่อที่มีความไวของการตรวจเทียบเคียงกับวิธี PCR (Liu; et al. 2002: 11 - 18)

กุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เป็นครัสเตเชียชนิดหนึ่งที่มีรายงานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (Lo; et al. 1996: 131 - 140) อย่างไรก็ตาม การศึกษาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งก้ามกรามขั้นต้นพบว่า กุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถรอดชีวิตและคาดว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวนี้อาจหายไปภายหลังการรับเชื้อเข้าไปเป็น

ระยะเวลาอย่างน้อย 30 วัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวของ กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* เนื่องจากกุ้งชนิดนี้อาจมีความสามารถในการต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธี PCR เพื่อตรวจการติดเชื้อไวรัสเบื้องต้นและยืนยันผลการทดลอง ด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

อย่างไรก็ตามการศึกษารังนี้ได้มีการศึกษากุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* กุ้งฝอยน้ำจืด *M. lanchesteri* กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และกุ้งในวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ *Caridina* sp. ซึ่งกุ้งเหล่านี้พบในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในเขตน้ำจืดและน้ำเค็ม

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อสำรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติของกุ้งชนิดต่างๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้ง กูลาดำ การติดไวรัสจากการทดลองด้วยวิธีการให้กินเนื้อกุ้งกูลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและการติดเชื้อจากการทดลองโดยวิธีการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae บางชนิดที่อาจมีความสามารถในการต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวและอาจเป็นพาหะนำไวรัสตัวแดงดวงขาว
2. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการวางแผนการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. สำรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติของกุ้งชนิดต่างๆ ในวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae ในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้ง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา จังหวัดสมุทรปราการ และจังหวัดชลบุรี จำนวนกุ้งในแต่ละชนิดประมาณ 10 - 15 ตัว
2. เหนี่ยวนำการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการให้กินเนื้อกุ้งกูลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae จำนวนกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองประมาณ 10 - 25 ตัว
3. เหนี่ยวนำการติดเชื้อโดยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งวงศ์ Palaemonidae จำนวนกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองประมาณ 10 ตัว
4. ตรวจหาการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติจากแหล่งเพาะเลี้ยงและที่เหนี่ยวนำการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการให้กินเนื้อกุ้งกูลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวและการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae โดยวิธี PCR

5. ยืนยันผลการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae ตามธรรมชาติจากแหล่งเพาะเลี้ยงและที่เหนียวนำการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวและโดยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี indirect peroxidase immunohistochemistry

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ศัพท์ที่ 1 White Spot Syndrome Virus (WSSV) หมายถึง ไวรัสตัวแดงดวงขาวมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (Bacilliform morphology) ขนาด 275 x 120 นาโนเมตร อนุภาคไวรัส นิวคลีโอแคปซิด (Nucleocapsid) รูปท่อนอัดตัวแน่นภายใต้เยื่อหุ้ม 3 ชั้น (Trilaminar envelope) นิวคลีโอแคปซิดที่ปราศจากเยื่อหุ้มมีขนาด 300 x 70 นาโนเมตร ภายในนิวคลีโอแคปซิด บรรจุด้วย DNA เส้นคู่เชื่อมต่อกันเป็นวง อนุภาคไวรัสประกอบด้วยเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสประกอบด้วยโปรตีนหลักๆ 2 ชนิด คือ โปรตีนที่มีขนาด 28 และ 19 กิโลดาลตัน ในขณะที่นิวคลีโอแคปซิดประกอบด้วยโปรตีนหลักๆ 3 ชนิดที่มีขนาด 15 24 และ 26 กิโลดาลตัน

2. ศัพท์ที่ 2 Polymerase Chain Reaction (PCR) หมายถึง วิธีการสำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สนใจในห้องปฏิบัติการได้อย่างรวดเร็วไม่ว่าจะเป็นไวรัส แบคทีเรีย หรือสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยอาศัยหลักการ DNA Replication ใช้ไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotide primer) สายสั้นๆ ประมาณ 15 - 40 เบส ที่มีความสอดคล้องกับ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวนในการเพิ่มปริมาณ DNA จะเติมเอนไซม์ DNA polymerase เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้นได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย

3. ศัพท์ที่ 3 Indirect peroxidase immunohistochemistry หมายถึง เทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน (Antigen) ในเนื้อเยื่อโดยอาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (Antibody) ที่มีความจำเพาะต่อกัน เทคนิคนี้จะใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยสารบางชนิด เช่น เอนไซม์ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ horseradish peroxidase นำมาติดกับแอนติบอดีตัวที่สอง จากนั้นตรวจสอบการมีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยตรวจดูการเปลี่ยนของซับสเตรต คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และสารที่ทำให้เกิดสี (Chromogen) คือ 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase กลายเป็นผลิตภัณฑ์ (Product) ได้แก่ ออกซิเจนและน้ำ ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB ทำให้สารละลายเปลี่ยนสภาพเป็นตะกอนสีน้ำตาลอยู่บริเวณที่แอนติบอดีจับกับแอนติเจนซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งที่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา

สมมติฐานในการวิจัย

กุ้งในวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae ที่อาศัยอยู่ในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำหรือที่อาศัยในแหล่งน้ำตามธรรมชาติอาจมีความสามารถในการต้านทานการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว และมีศักยภาพในการเป็นพาหะไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสดวงขาว หรือ ตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus = WSSV)

โรคตัวแดงดวงขาวเป็นโรคที่เกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome: WSSV) เมื่อกุ้งได้รับไวรัสนี้จะทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว โดยจะส่งผลให้เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงกุ้งได้รับความเสียหาย (Takahashi; et al. 1994: 121–125; Chou; et al. 1995: 133–141, Wongteerasupaya; et al. 1995: 69–7; Lightner. 1996; Lo; et al. 1996a: 133–141, 1996b: 215–225 & Flegel. 1997: 285–296) ในปี ค.ศ. 1993 ได้มีการตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และ red-tail shrimp (*P. penicillatus*) (Chou; et al. 1995: 133–141) พบว่ากุ้งจะมีอาการตัวแดงและมีจุดขาวในเปลือกและผิวหนังของกุ้ง การที่กุ้งปรากฏอาการดวงขาวนั้นไม่ได้เป็นอาการที่เกิดขึ้นในระยะสุดท้ายของการได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวเสมอไป ตัวอย่างเช่น กุ้งที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวและมีอาการลำตัวเป็นดวงขาวอาจจะมีชีวิตอยู่รอดได้ ถ้าเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ก่อให้เกิดอาการเครียดแก่กุ้ง อย่างไรก็ตามถ้ากุ้งได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น กุ้งมีอาการเฉื่อยชาไม่กระปรีกระเป่า เชื่องซึม ลำตัวมีสีชมพูถึงสีน้ำตาลแดง รวมทั้งลอยตัวอยู่ริมขอบบ่อ นอกจากนี้ในระหว่างที่ได้รับไวรัsgุ้งจะกินอาหารได้น้อยลง ต่อมาก็จะมีอัตราการตายสูงซึ่งสังเกตเห็นได้ภายใน 2–3 วัน หลังจากได้รับเชื้อและสามารถทำให้กุ้งตายได้ทั้งหมด ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากและจนกระทั่งบัดนี้ยังไม่มีรายงานการต้านทานต่อไวรัสชนิดนี้ของกุ้งสปีชีส์ต่างๆ ทั้งในได้หวันหรือจากแหล่งอื่นๆ (Lightner. 1998: 201–220) ไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถติดเชื้อในโฮสต์ได้หลายชนิดไม่ใช่เฉพาะกุ้งเท่านั้นแต่ยังรวมถึงปู และอาร์โทรพอดอื่นๆ ด้วย เช่น copepods insects และ pest prawns (Lo; et al. 1996: 133–141; Chen; et al. 2000: 157–161)

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome: WSSV)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวจัดเป็นไวรัสที่มีขนาดใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่เชื่อมต่อกันเป็นวง (dsDNA) พบการติดไวรัสในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียหลายชนิดตั้งแต่กุ้งและปูที่อาศัยในน้ำเค็มและน้ำกร่อย รวมไปถึงกุ้ง crayfish ที่อาศัยในน้ำจืด โฮสต์ที่ได้รับไวรัสชนิดนี้จะถูกโจมตีและตายลงอย่างรวดเร็ว (Chou; et al. 1995: 133–141; Chang; et al. 1996: 131–139) อวัยวะเป้าหมายในการติดไวรัส คือ เนื้อเยื่อต่างๆ ที่มีกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อชนิด mesoderm และ ectoderm ได้แก่ เหงือก (Gill) เนื้อเยื่อน้ำเหลือง (Lymphoid organ) และเนื้อเยื่อใต้เปลือก (Cuticular epithelium) โดยไวรัส

จะเข้าไปเพิ่มจำนวนและประกอบเป็นอนุภาคไวรัสใหม่ภายในนิวเคลียสและถูกปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ที่ติดไวรัสนั้นแตกออก จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) โครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆ ของจีโนม (Genomic structure and composition) และสายวิวัฒนาการ (Evolution) จำแนกไวรัสได้ดังนี้

Family	Nimaviridae
Genus	Whispovirus
Species	White spot syndrome virus

ไวรัสตัวแดงดวงขาวจัดอยู่ใน Family Nimaviridae เนื่องจากอนุภาคไวรัสมีส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายหาง (Nima เป็นภาษาละตินหมายถึงหาง) และเป็น species เดียวของ family นี้ ชื่ออื่นๆ ที่มีรายงานในการวิจัยต่างๆ นอกจากไวรัสตัวแดงดวงขาว คือ HHNBV (Hypodermic and Hematopoietic Necrosis Baculovirus), RV-PJ (Rod Shaped Nuclear Virus of *Penaeus japonicus*), SEMBV (Systemic Ectodermal Mesodermal Baculovirus) และ WSBV (White Spot Baculovirus) (Chang; et al. 1996: 133-141; Lo; et al. 1996b: 215-225; 1997: 53-72)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวมีอนุภาคขนาดใหญ่ (Chou; et al. 1995: 133-141; Wang; et al. 1995: 297-302 & Lo; et al. 1996b: 133-141) มีขนาดประมาณ 275×120 นาโนเมตร ที่ปลายด้านหนึ่งของอนุภาคไวรัสมีส่วนของระยางค์ที่ยื่นออกมาลักษณะคล้ายหาง (Tail like) อนุภาคไวรัสประกอบด้วยนิวคลีโอแคปซิด (Nucleocapsid) รูปท่อนซึ่งอัดตัวแน่น ภายใต้อีเอนหุ้ม 3 ชั้น (Trilaminar envelope) นิวคลีโอแคปซิดที่ปราศจากอีเอนหุ้มมีขนาด 300×70 นาโนเมตร องค์ประกอบของ capsid จะเกิดจาก capsomer ที่เรียงตัวแบบ parallel cross striations ดังนั้น capsid จึงดูคล้ายประกอบด้วยวงแหวนของ subunits เรียงตัวตั้งฉากกับความยาวของแกนของ capsid ความหนาของวงแหวนประมาณ 20 นาโนเมตร (Wang; et al. 1995: 239-242) ภายในนิวคลีโอแคปซิดบรรจุด้วย DNA เส้นคู่ที่เชื่อมต่อกันเป็นวง อนุภาคของไวรัสประกอบด้วย polypeptide สำคัญๆ อย่างน้อย 5 ชนิด ที่มีขนาดต่างๆ ระหว่าง 15 – 28 กิโลดาลตัน โดยเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสประกอบด้วยโปรตีนหลักๆ 2 ชนิด คือ โปรตีนที่มีขนาด 28 และ 19 กิโลดาลตัน ในขณะที่นิวคลีโอแคปซิดประกอบด้วยโปรตีนหลักๆ ชนิดที่มีขนาด 26 24 และ 15 กิโลดาลตัน โดยโปรตีนขนาด 28 กิโลดาลตัน (VP28) ที่อยู่บนผิวของอนุภาคไวรัสมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการติดไวรัส (Van Hulten; et al. 2001b: 228-233) สำหรับโปรตีนขนาด 15 กิโลดาลตัน จะทำหน้าที่เป็น DNA-binding protein เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีประจุบวกสูง (Highly basic protein) และไม่มีส่วนที่เป็น hydrophobic

เช่นเดียวกับโปรตีนที่เป็น histone-like protein นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่นๆ ของไวรัสที่ได้จัดจำแนกไว้แล้วอีก 14 ชนิดรวมทั้ง collagen-like ORF ด้วย (Van Hulten; et al. 2001a: 7–22 ; 2002: 1069–1074)

ไวรัสตัวแดงดวงขาวจัดเป็นไวรัสสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด จากการศึกษาลำดับเบสในจีโนม (Genome) ที่มีรายงานไว้แล้วพบว่าจีโนมของไวรัสมีขนาดประมาณ 300 กิโลเบส ประกอบด้วยยีนที่เป็นรหัส (Open reading frame) อยู่ 184 ORFs โดย 94% ของ ORFs ทั้งหมดยังไม่ทราบหน้าที่ เนื่องจากไม่มีส่วนคล้ายคลึงกัน (Homology) กับโปรตีนอื่นๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลต่างๆ พบลักษณะพิเศษของยีนในไวรัสตัวแดงดวงขาวคือมี ORF ขนาด 18,234 นิวคลีโอไทด์ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน (เป็น collagen-like ORF) และมีส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส 9 ขึ้น กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม โดยแต่ละชั้นจะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสซ้ำต่อเนื่อง (Tandem repeats) ขนาด 250 bp (Van Hulten; et al. 2001b: 7–22)

การศึกษาไวรัสตัวแดงดวงขาวและวิเคราะห์การติดไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว

ชู และคณะ (Chou; et al. 1995: 133–141) ได้ทำการศึกษาพบว่าโรคแพะระบาดอย่างรุนแรงในกึ่งเพาะเลี้ยงตระกูล Penaeid หลายชนิดในประเทศไต้หวัน รวมทั้งกึ่งกุลาดำ (*P. monodon*) กึ่งคูรูมา (*P. japonicus*) และกึ่งหางแดง (*P. penicillatus*) กึ่งที่เป็นโรคเหล่านี้จะมีอาการปรากฏให้เห็นคือ เป็นดวงขาวบนแผ่นแก้มปิดเหงือก (Carapace) บนรยางค์ (Appendages) และที่ผิวลำตัว ลักษณะอาการที่ปรากฏนี้เรียกว่า White Spot Syndrome (WSS) กึ่งคูรูมา (*P. japonicus*) ปกติจะแสดงอาการดวงขาวเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำกรองได้จากการเพาะเลี้ยงกึ่งคูรูมา (*P. japonicus*) และกึ่งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เป็นโรค กึ่งที่เป็นโรคนี้จะมีอัตราการตายสะสมเป็น 100% ภายใน 5 – 7 วัน โดยเป็นผลมาจากความเครียดจากการจับและอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงร่วมด้วย จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามีอนุภาคของไวรัสซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อน (Non-occluded rod-shaped viral particle) อยู่ที่ผิวหนัง (Epidermis) ของกึ่งคูรูมาที่ได้รับเชื้อเองตามธรรมชาติและจากการได้รับเชื้อในห้องทดลอง อนุภาคของไวรัสเหล่านี้ถูกปกคลุมด้วยเปลือกหุ้มอนุภาคมีความยาว 330 ± 20 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 87 ± 7 นาโนเมตร ลักษณะอาการที่ปรากฏภายนอกและสัณฐานวิทยาของไวรัสมีความคล้ายคลึงกันทั้งในกึ่งที่ได้รับเชื้อเองตามธรรมชาติและกึ่งที่ถูกทำให้ได้รับเชื้อในห้องทดลอง ซึ่งข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าไวรัสรูปท่อนชนิดนี้อาจจะเป็นสาเหตุหลักของการที่กึ่งเป็นโรค White Spot Syndrome ในประเทศไต้หวัน

วอง และคณะ (Wang; et al. 1995: 239–242) ได้เก็บรวบรวมกึ่งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่เป็นโรคทางตอนใต้ของประเทศไต้หวันแล้วนำมาตรวจลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ ประกอบกับการ

ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ากึ่งกุลาดำที่เป็นโรคมักมีลักษณะเป็นดวงขาวบริเวณเปลือกกระพุ้งแก้มที่ปิดเหงือก ขณะที่ผลจากการศึกษาทางด้าน histology พบว่าผิวหนังของกุ้งที่เป็นโรคได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวและเซลล์ของเนื้อเยื่อนี้จะสลายตัว (Degenerated cell) นิวเคลียสขยายใหญ่และเมื่อนำเยื่อผิวหนังของกึ่งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวไปทำ ultrathin section แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ปรากฏว่าพบ non-occluded baculo-like viral particles จำนวนมากในบริเวณที่มีการตายของเนื้อเยื่อ (Necrotic areas) นิวเคลียสที่มีการขยายใหญ่จะเต็มไปด้วยอนุภาคของไวรัส อนุภาคของไวรัสมีรูปร่างเป็น fusiform หรือ rod shaped บริเวณปลายของอนุภาคกลมมนคล้ายลูกปัด เมื่อย้อมสีแบบ negative stained พบว่าอนุภาคไวรัสมีความกว้าง 70 – 150 นาโนเมตร มีความยาว 330 – 350 นาโนเมตร บางอนุภาคมี tail-like projection ยื่นออกมาจากปลายด้านหนึ่งของอนุภาค ส่วนที่เป็นนิวคลีโอแคปซิดไม่มีเปลือกหุ้ม อนุภาคไวรัสมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 58 – 67 นาโนเมตร และมีความยาว 330 – 350 นาโนเมตร ขณะที่นิวคลีโอแคปซิดประกอบด้วยวงแหวนของ subunits เรียงต่อกันเป็นอนุกรม ความหนาของวงแหวนค่อนข้างคงที่คือ 20 นาโนเมตร สันฐานวิทยาของไวรัสตัวแดงดวงขาวคล้ายกับ SEMBV (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus) แต่แตกต่างจาก BMN (Baculoviral Midgut gland Necrosis virus) และ PmSNPV (*P. monodon* Single Nucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus = MBV)

โล และคณะ (Lo; et al. 1996: 131–140) ได้ตรวจพบไวรัสทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Baculovirus : WSBV) ในกุ้งหลายชนิดในประเทศต่างๆ ของทวีปเอเชียโดยใช้ 1-step PCR reaction นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้พัฒนานิเวศวิทยาการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีความไวสูงคือการใช้ 2-step PCR amplification โดยใช้ nested primers ที่มีความไวสำหรับตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เทคนิค PCR ความไวของการตรวจวินิจฉัยโดยใช้ 2-step PCR สูงกว่า 1-step PCR ประมาณ $10^3 - 10^4$ เท่า และจากการใช้ 2 เทคนิคนี้คือ 1 และ 2-step PCR ทำให้ประสบความสำเร็จในการตรวจหา DNA ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งที่เพาะเลี้ยง ได้แก่ กึ่งกุลาดำ (*P. monodon*) กุ้งกุลารุมา (*P. japonicus*) กุ้งหางแดง (*P. penicillatus*) และกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) พบว่า กุ้งเหล่านี้มีอาการตัวแดงดวงขาวซึ่งกุ้งเหล่านี้เก็บรวบรวมได้จากฟาร์มกุ้งบริเวณต่างๆ กัน จากการตรวจวิเคราะห์ DNA ที่สกัดได้จากกุ้งที่เก็บรวบรวมได้โดยใช้ 1-step PCR amplification พบว่า ให้ PCR product ขนาด 1,477 bp นอกจากนี้ยังพบว่ามีบางตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์คือ ปูทะเล (*Scylla serrata*) ที่เพาะเลี้ยงได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย เมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 1-step PCR ขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ จะให้ผลบวกเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 2-step PCR amplification ในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว specific DNA fragment ของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) พบว่า

กุ้งชนิดนี้ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ทำให้คณะผู้วิจัยยืนยันว่า กุ้งที่จับได้จากธรรมชาตินั้น ได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งครูลมา กุ้ง *P. semisulcatus* กุ้งหางแดง (*P. penicillatus*) ปูกางเขน (*Charybdis feriatus*) ปูม้า (*Portunas pelagicus*) และปูสามจุด (*P. sanguinolentus*) ซึ่งรวบรวมได้จากชายฝั่งทางใต้ของประเทศไต้หวันได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย และจากการตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวในอาร์โทรพอดซึ่งรวบรวมได้จากฟาร์มกุ้งที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวปรากฏว่าไรน้ำ (*Helice tridens*) small pest (Palaemonidae shrimp) และตัวอ่อนของ แมลงจำพวก Ephyridae เป็นแหล่งสะสมไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยอาจถ่ายทอดเชื้อสู่ฟาร์มกุ้งกุลาดำได้

แซง และคณะ (Chang; et al. 1996: 131–139) ได้ทำการตรวจหาอวัยวะเป้าหมายของไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยตัดเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อเข้าไปที่เวลา 0 16 22 52 และ 64 ชั่วโมง มาตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization โดยทำการ hybridized เนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อซึ่งผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้วด้วย PMNOBIII (*P. monodon* non – occluded baculovirus III) DNA probe ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin พบเซลล์ที่เริ่มให้ผลบวกกับการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เทคนิคนี้ 16 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อคือ เซลล์ของกระเพาะอาหาร เหงือก cuticular epidermis และ ตับ-ตับอ่อน ขณะที่เวลา 22 ชั่วโมงหลังจากได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวที่อวัยวะน้ำเหลือง antennal gland เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด midgut และ hind gut ส่วนเนื้อเยื่อประสาทและตาประกอบ (Compound eyes) จะพบไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังจากได้รับเชื้อเข้าไปแล้ว 40 ชั่วโมง เนื้อเยื่อต่างๆ ที่พัฒนามาจาก mesoderm และ ectoderm เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อผิวหนัง เนื้อเยื่อประสาท และกล้ามเนื้อ สามารถถูก infected และที่เวลา 52 และ 64 ชั่วโมงหลังจากการได้รับเชื้อ พบว่า กระเพาะอาหาร เหงือก cuticular epidermis อวัยวะน้ำเหลือง เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด และ antennal gland มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรงจนกระทั่งเนื้อเยื่อเหล่านี้กลายเป็น necrotic ส่วนอาการตัวแดงดวงขาวจะสังเกตเห็นเมื่อได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าไปแล้ว 40 ชั่วโมง และกุ้งจะเริ่มตายที่เวลา 64 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ ขณะที่ probe ไม่ให้ผลบวกกับเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว

โล และคณะ (Lo; et al. 1997: 53–72) ได้ทำการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวและชนิดของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ (Tissue tropism) ของไวรัสชนิดนี้ในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) โดยเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำ พ่อแม่พันธุ์จากชายฝั่งทางตอนใต้ของประเทศไต้หวันระหว่างเดือนกรกฎาคม 1995 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 1996 นำเอา pleopods ออกมาแยกแล้วสกัด DNA เพื่อใช้เป็น template ในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้เทคนิค PCR พบว่า กุ้งกุลาดำเพศผู้ 40% ให้ผลบวกกับขั้นตอนแรกของการ amplified ทั้ง 2 ขั้นตอน นอกจากนี้ยังพบว่าการแพร่กระจายของไวรัสตัวแดงดวงขาวในพ่อแม่พันธุ์กุ้งจะมีแพร่กระจายมากในช่วงฤดูร้อนถึงฤดูใบไม้ร่วง (กรกฎาคมถึงพฤศจิกายน) ส่วนฤดู

หนาว (ธันวาคมถึงกุมภาพันธ์) จะพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้น้อย จากการศึกษาความชอบเนื้อเยื่อของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิค PCR และตรวจดูเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านร่วมกันเพื่อตรวจหาตำแหน่งที่มีการเพิ่มจำนวนไวรัส พบว่า pleopods เหงือก กระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อท้อง เลือด midgut หัวใจ peripods อวัยวะน้ำเหลือง เปลือกหุ้มลำตัว เนื้อเยื่อประสาท ตับและตับอ่อน อัณฑะ รังไข่ spermatophore และก้านตาเป็นแหล่งที่ไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการเพิ่มจำนวนและจากการตรวจด้วย *in situ* hybridization ร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า มีไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ (Reproductive organs) ของกุ้งกุลาดำ โดยในอัณฑะเซลล์ที่ตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวอยู่ที่บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ล้อมรอบหลอดสร้างตัวอสุจิ (Seminiferous tubules) แต่ไม่พบใน germ cells ในเนื้อเยื่อของ spermatophore เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อเยื่อ spermatophore เท่านั้นที่พบไวรัสตัวแดงดวงขาว ส่วนในรังไข่นั้นพบไวรัสตัวแดงดวงขาวในเซลล์ฟอลลิเคิล (Follicle cells) โอโอโกเนีย (Oogonia) และเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่าเซลล์ปกติ 2 – 3 เท่า และเป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์ที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาวส่วนใหญ่จะอยู่ที่ epidermis อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบว่ามี mature eggs ถูก infected ด้วยไวรัสตัวแดงดวงขาวอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ไข่ที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวถูกฆ่าโดยไวรัสก่อนที่จะถึง maturation นอกจากนี้ยังตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวในปูสามจุด ที่ใช้เป็นอาหารของกุ้งกุลาดำ โดยเทคนิค PCR เมื่อตรวจผลซ้ำด้วยวิธีทาง histology เช่น *in situ* hybridization และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า มีอวัยวะ 3 ชนิดที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้แก่ หัวใจ กระเพาะอาหาร และ midgut ซึ่งภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านสามารถเห็นอนุภาคของไวรัสชนิดนี้ในเซลล์ทั่วไปและไม่มีความแตกต่างระหว่างไวรัสตัวแดงดวงขาวที่พบครั้งนี้เทียบกับการศึกษาของคนอื่นๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน

ทาเปย์ และคณะ (Tapay; et al. 1997: 285 - 292) ได้ทำการแยก Chinese Baculovirus-like Virus (CBV) จาก cephalothorax ของกุ้งคูรูมา (*P. japonicus*) ที่เป็นโรคซึ่งนำมาจากประเทศจีน โดยบด cephalothorax ใน antibiotic incubation medium (AIM) ซึ่งประกอบด้วยเพนิซิลิน เจนตามัยซิน สเตรปโตมัยซิน และแอมโฟเทอริซิน แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงรวบรวมส่วนใสมากรองผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.2 ไมครอน นำไวรัสที่เตรียมได้มาฉีดเข้ากล้ามเนื้อของกุ้ง *P. stylirostris* blue shrimp และ *P. vannamei* white shrimp ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 4-20 กรัม ปริมาตร 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อตัว ขณะที่กุ้งกลุ่มควบคุมเป็นกุ้งปกติที่ไม่ได้รับเชื้อมาก่อนโดยฉีดด้วย TNE buffer (pH 7.4) ทำการเลี้ยงสัตว์ทดลองที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทุกวัน บันทึกจำนวนกุ้งที่ตาย ส่วนกุ้งที่กำลังจะตายจะถูกแยกออกจากอ่างเพาะเลี้ยงและนำมาศึกษาทาง histopathology พบว่ากุ้งทั้ง 2

สปีชีส์ที่ได้รับเชื้อ CBV จะเริ่มตายภายใน 2 วันและตายลงทั้งหมดภายในเวลา 4 วัน อัตราการตายสะสมของกุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ ที่เวลา 2 วันหลังจากได้รับเชื้อคือ 14% สำหรับ white shrimp และ 17% สำหรับ blue shrimp ส่วนอัตราการตายสะสมของกุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ที่เวลา 3 วันหลังจากได้รับเชื้อคือ 57% สำหรับ white shrimp และ 73% สำหรับ blue shrimp และกุ้งทั้ง 2 สปีชีส์จะตายลงทั้งหมด (100%) หลังจากได้รับเชื้อ 4 วัน ส่วนกุ้งกลุ่มควบคุมไม่พบการตายและจากการศึกษาทางด้าน histopathology โดยนำเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของกุ้งที่ได้รับเชื้อและกุ้งกลุ่มควบคุม fixed ใน Davidson's fixative และผ่านกระบวนการต่างๆ แล้วนำส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า กุ้งทั้ง 2 สปีชีส์แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อคล้ายๆ กัน โดยพบใน loose connective tissue ทุกบริเวณ cuticular epidermis อวัยวะน้ำเหลือง และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด antennal gland ของกุ้งที่ได้รับเชื้อ CBV จะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ ส่วนการศึกษาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยนำชิ้นส่วนของเหงือก ตับและตับอ่อน ของกุ้งตัวอย่างที่ได้รับเชื้อ CBV และกุ้งกลุ่มควบคุมมา fixed ด้วย 3% glutaraldehyde ใน 0.5 M cacodylate buffer (pH 7.0) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง นำตัวอย่างไป fixed อีกครั้งใน 1.5% osmium tetroxide ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า CBV มีการขยายตัว อนุภาคของไวรัสมีเปลือกหุ้มหลายชั้น มีความยาวเฉลี่ย 265 ± 20 นาโนเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลาง 120 ± 10 นาโนเมตร (จำนวนตัวอย่าง 20 ตัว) ความยาวของนิวคลีโอแคปซิด 205 ± 12 นาโนเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลาง 78 ± 5 นาโนเมตร ช่องว่างระหว่างเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสและนิวคลีโอแคปซิด 12 ± 2 นาโนเมตร ส่วนตับและตับอ่อนของกุ้งที่ได้รับเชื้อไม่ปรากฏอาการเช่นที่พบในเนื้อเยื่อเหงือกเช่นเดียวกับกุ้งกลุ่มควบคุม

กาญจนาภูมิ และคณะ (Kanchanaphum; et al. 1998: 1-7) ทำการศึกษาถึงความสามารถในการถ่ายทอดไวรัสตัวแดงดวงขาวของปู 3 ชนิดที่คาดว่าจะเป็พาหนะของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แก่ ปูแสม (*Sesarma* sp.) ปูทะเล (*S. serrata*) และปูก้ามดาบ (*Uca pugilator*) โดยการทดลองเหนี่ยวนำไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดให้แก่ปูทั้งหมด ผลที่ได้พบว่าปูเหล่านี้ก็ยังไม่แสดงอาการออกมาให้เห็น และไม่มีการตายเกิดขึ้นตลอดช่วง 45 วันของการทดลอง ซึ่งขั้นตอนนี้ตรวจสอบด้วยผลของ histology, specific *in situ* DNA hybridization และเทคนิคทาง PCR หลังจากนั้นนำเอาปูทั้งหมดที่มีเชื้อไวรัสไปเลี้ยงรวมกัน กับกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ที่ปกติพบการถ่ายทอดไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำได้ โดยผ่านทางน้ำที่เลี้ยงอยู่ในบ่อเดียวกัน การถ่ายทอดไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำตรวจพบได้ด้วยวิธี *in situ* hybridization และเทคนิค PCR หลังจากที้นำไปเลี้ยงรวมกันรวมทั้งหมด 12 ชั่วโมง สำหรับปูก้ามดาบ *U. pugilator* เกิดการถ่ายทอดไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่กุ้งกุลาดำได้ ซึ่งตรวจพบโดยเทคนิค PCR หลังระยะเวลาที่อยู่ร่วมกัน 24 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 60 ชั่วโมง ในปูทะเล *S. serrata* ตรวจจากเทคนิค PCR พบที่เวลา 48 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 60 ชั่วโมง และในปูแสม

(S. sp.) ตรวจจากเทคนิค PCR พบที่เวลา 48 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษาเป็นการจำลองสถานการณ์ของการถ่ายทอดไวรัสจากพาหะนำโรคไปสู่กุ้งกุลาดำซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในบ่อกุ้ง อย่างไรก็ตามการทดลองนี้มีปัจจัยของจำนวนสัตว์ทดลองที่น้อยกว่าจริงและน้ำทะเลที่ใช้นั้นมีความสะอาดกว่าบ่อเลี้ยงสภาพจริง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลทำให้อัตราการถ่ายทอดไวรัสนั้นเปลี่ยนแปลงไป จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษากันต่อไปถึงปัจจัยของขนาดบ่อเพาะเลี้ยงคุณภาพน้ำ และพฤติกรรมกรการอยู่ร่วมกันในบ่อที่เป็นสถานที่จริง

ศุภมาศ และคณะ (Supamattaya; et al. 1998: 79 – 85) ได้ศึกษาการถ่ายทอดไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวไปยังสัตว์ครัสตาเซียน 3 ชนิดที่มักพบเป็นประจำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ปูม้า (*P. pelagicus*) ปูทะเล (*S. serrata*) และกุ้งเคย (*Acetes* sp.) สำหรับการเตรียมสารสกัดจากเหงือก ทำโดยนำเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวมาบดใน lobster haemolymph medium (LHM), pH 7.4 อัตราส่วนเนื้อเยื่อต่อ LHM เท่ากับ 1 : 10 บั่นแยกตะกอนทิ้งที่ 3,000g เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสนำมากรองผ่านเมมเบรนปลอดเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.22 ไมโครเมตร ทำการตรวจเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยการย้อมสีแบบ negative staining โดยใช้ phosphotungstic acid แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด สารสกัดที่ได้จะนำไปฉีดและจุ่ม (Immersion) สัตว์ทดลอง ทำการทดลองโดยให้กุ้งเคยได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีด การจุ่ม และการกินเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคเข้าไปในเวลาต่างๆ กัน ส่วนปูทั้ง 2 ชนิดทำให้ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดและการกินเท่านั้น จากนั้นนำมาตรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาว ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์ครัสตาเซียนทั้ง 3 ชนิด โดยวิธีการทาง histology กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และ *in situ* hybridization โดยใช้เนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำปกติที่ไม่ติดเชื้อและเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็น negative และ positive control ตามลำดับ พบว่ากุ้งเคยมีลำตัวสีแดงภายใน 24 – 48 ชั่วโมง หลังจากฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาว และการให้ได้รับไวรัสโดยการฉีดจะให้ผลดีที่สุดคืออัตราการตายเป็น 100% ภายใน 3 วัน รองลงมาคือ การจุ่มกุ้งเคยในสารสกัดจากเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ซึ่งจะมีการตายทั้งหมดภายในเวลา 5 วัน และการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคจะทำให้กุ้งเคยตายลง 20% ภายในเวลา 9 วัน การให้ปูทั้ง 2 ชนิดกินเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ปูทั้ง 2 ชนิดยังสามารถดำรงชีวิตได้มากกว่า 9 วัน จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวไม่จำเป็นที่สัตว์ทดลองนั้นจะต้องตายลงทั้งหมด จึงเป็นไปได้ว่ากุ้งเคยและปูทั้ง 2 ชนิด เป็นแหล่งพาหะของไวรัส และนำไวรัสจากบ่อหนึ่งไปยังอีกบ่อหนึ่งได้ และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ผลการศึกษาทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยังพบว่า เซลล์เม็ดเลือด เซลล์เหงือก และเซลล์เยื่อบุผิวของกุ้งเคยที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาว จะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ ลักษณะเช่นนี้ก็พบในปูทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับไวรัสด้วย

เช่นกัน และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าอนุภาคของไวรัสชนิดนี้มีรูปร่างเป็นท่อน เช่นเดียวกับที่พบในกึ่งกลาดำที่เป็นโรคและมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว ในเนื้อเยื่อโดยใช้ *in situ* hybridization ที่ใช้ probe ขนาด 4.2 กิโลเบส ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin ซึ่งมีความจำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองทั้ง 3 ชนิดที่มีนิวเคลียสขยายใหญ่ให้ผลบวกกับ *in situ* hybridization ในทางตรงกันข้ามเซลล์ของเนื้อเยื่อกุ้งและปูปกติไม่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยานี้

นาดาลา และคณะ (Nadala; et al. 1998: 221–229) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) คุณลักษณะทางชีวเคมีและจีโนมของไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว 3 ไอโซเลต (Isolate) ซึ่งแยกได้จากกึ่งทะเลสาบ *Penaeid* 3 ชนิดที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ กัน โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เมื่อย้อมตัวอย่างแบบ negative strain การวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอนุภาคไวรัสด้วย sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) การวิเคราะห์ด้วย Western blot และ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) จากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลต มีโครงสร้างคล้ายกับ baculovirus ที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว ความกว้างยาวของนิวคลีโอโปรตีนเหมือนกันทั้ง 3 ไอโซเลต กล่าวคือ มีความยาวประมาณ 316–350 นาโนเมตร และจากการศึกษาด้วย SDS–PAGE พบว่า ไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลตมีแถบโปรตีนอย่างน้อย 3 แถบที่พบในทั้ง 3 ไอโซเลตมีตำแหน่งตรงกันและจากการวิเคราะห์จีโนมของไวรัสด้วยเทคนิค RFLP โดยตัด DNA ของไวรัสด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ปรากฏว่า ถึงแม้ว่า 3 ไอโซเลตจะเหมือนกันเมื่อตัดด้วย *EcoRI* แต่ไวรัสที่แยกได้จากกึ่งคูลูมา (*P. japonicus*) ซึ่งเก็บรวบรวมมาจากประเทศจีนจะมีจีโนมที่แตกต่างจากไวรัสอีก 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากกึ่งกลาดำ (*P. monodon*) ซึ่งรวบรวมมาจากประเทศอินโดนีเซียและกึ่ง *P. sertiferus* ซึ่งรวบรวมมาจากประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อตัดด้วย *HindIII*

แปง และคณะ (Peng; et al. 1998: 253–262) ได้ศึกษาไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นตัวกลางสำคัญของโรคที่เกิดกับกึ่ง *Penaeid* และส่งผลกระทบต่อให้กับธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมากครั้งหนึ่ง เคยเชื่อว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวไม่ติดในกึ่งชนิดนี้ แต่ในปัจจุบันนี้ได้มีการตรวจพบอาการของโรคนี้ใน exoskeleton ของกึ่งในรายงานฉบับนี้ได้ทำการพิสูจน์ว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ถูกตรวจพบใน กุ้งก้ามกราม ในระยะ larvae, postlarvae, juveniles และ adults โดยได้ PCR product ที่ได้จาก DNA ของกุ้งก้ามกราม ที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวนอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบการตัด PCR ทั้งสองโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *HaeIII*, *HpaII*, *RsaI* และ *SauIII* ไม่ต่างกันแสดงให้เห็นว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งก้ามกราม และกึ่งกลาดำมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดหรืออาจจะเป็นชนิดเดียวกันได้มีการทดลองนำเนื้อกึ่งกลาดำ แซ่แซ่ที่ได้ตรวจสอบการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี

one step PCR มาบดและทำให้เจือจางจากนั้นได้เติมเนื้อกุ้งนี้ลงไปบดกุ้ง *M. rosenbergii* ระยะ larvae, postlarvae ที่ปกติเพื่อทำให้กุ้ง ก้ามกรามติดเชื้อ หลังจากนั้นอีก 2 วัน จึงนำกุ้งก้ามกรามที่ตายแล้วมาตรวจสอบปรากฏว่าให้ผลบวกโดยการวิเคราะห์ทาง PCR

เกษรจันทร์ และคณะ (Kasornchandra; et al. 2000: 32–41) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ของการถ่ายทอดไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพ่อแม่กุ้งกุลาดำโดยตรวจสอบไวรัสจากตัวอย่างพ่อแม่กุ้งและลูกกุ้งระยะต่างๆ ที่ได้จากการเพาะฟักด้วยวิธี PCR และ *in situ* hybridization และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยแบ่งพ่อแม่กุ้งที่ผ่านการตรวจไวรัส SEMBV ออกเป็น 5 กลุ่ม โดยให้กุ้งทดลองแต่ละกลุ่มกินเนื้อปูติดเชื้อไวรัสวันละ 1 มื้อ ติดต่อกันเป็นเวลา 2 3 4 และ 5 วันตามลำดับ ส่วนกุ้งกลุ่มควบคุมให้กินเนื้อปูปกติที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัส เมื่อตรวจสอบการติดไวรัส SEMBV ในแม่กุ้งก่อนวางไข่ 1 วันด้วย one และ two-step PCR ปรากฏว่าแม่กุ้งที่กินเนื้อปู 2 วันให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยวิธี two-step PCR และจากการตรวจยืนยันผลการติดไวรัส SEMBV ในแม่กุ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และวิธี *in situ* hybridization พบไวรัส SEMBV ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) follicle cells และเซลล์ไข่อ่อน (Perinucleolus oocyte) และไข่ที่กำลังพัฒนา (Yolk oocyte) จากนั้นนำไข่กุ้งที่รวบรวมได้ไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนประมาณ 3 – 4 ครั้ง แล้วจึงย้ายไปลงถังเพาะฟักเพื่อให้เกิดการฟักตัวต่อไป ทำการอนุบาลลูกกุ้งต่อไปจนกระทั่งได้ลูกกุ้งระยะโพสต์ลารวา ในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งทำการเก็บตัวอย่างลูกกุ้งระยะต่างๆ คือ นอเพลียส ชูเอีย ไมซิส และโพสต์ลารวา เพื่อตรวจหาไวรัส SEMBV ด้วยวิธี PCR และ *in situ* hybridization ปรากฏว่าลูกกุ้งระยะนอเพลียสและชูเอียที่ได้จากแม่กุ้งที่ติดไวรัส SEMBV มีเพียงเล็กน้อยให้ผลเป็นบวกกับวิธี two – step PCR สำหรับลูกกุ้งกลุ่มที่เหลือทั้งหมดให้ผลบวกกับวิธี one – step PCR ส่วนแม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน ไข่กุ้งจะไม่ฟักเป็นนอเพลียส ขณะที่แม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ไข่กุ้งจะฝ่อเนื่องจากไข่กุ้งดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาเป็นไข่ที่สมบูรณ์ได้ สำหรับการตรวจด้วยวิธี *in situ* hybridization พบไวรัส SEMBV ในลูกกุ้งระยะไมซิสและโพสต์ลารวา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่ไวรัส SEMBV สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่สู่ลูกกุ้งกุลาดำ (Vertical transmission) โดยไวรัสจะเกาะติดที่ผิวไข่ สำหรับไข่อ่อน และไข่ที่กำลังพัฒนาเชื้อไวรัสจะเข้าสู่นิวเคลียสและเพิ่มจำนวนอนุภาคทำให้ไข่ของกุ้งไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้มีเพียงเฉพาะไข่ที่พัฒนาเป็นไข่แก่แล้วและมีเชื้อไวรัสเกาะอยู่ที่ผิวไข่เท่านั้นที่ฟักเป็นนอเพลียสที่ติดไวรัส SEMBV

เซ็น และคณะ (Chen; et al. 2000: 157–161) ได้ทำการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวใน benthic larvae ของปูทะเล (*S. serrata*) ซึ่งจับได้จากบริเวณชายฝั่งทางตอนใต้ของประเทศไทยวัน โดยใช้เทคนิค PCR และ *in situ* hybridization พบว่า ตัวอ่อนของปูทะเลประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ มีไวรัสตัวแดงดวงขาวแฝงอยู่ ถึงแม้ว่าจะย้ายตัวอ่อนเหล่านี้ไม่เลี้ยงในบ่อพักเลี้ยงที่มีการให้อาการ่วม

ด้วยในห้องปฏิบัติการก็ยังคงตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวอีกเช่นเดิม จากการทดลองนำตัวอ่อนของปูทะเลจำนวน 180 ตัว ซึ่งฟักออกจากไข่ที่ปราศจากไวรัสตัวแดงดวงขาวไปแช่น้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือจาง 1 : 50 ปนอยู่ซึ่งน้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือปนอยู่เตรียมได้จากแผ่นแก้วปิดเหงือกและเปลือกหุ้มลำตัว (Integument) น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรง (ให้ผลบวกกับ One-step PCR) นำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดให้เป็นเนื้อเดียวกันในน้ำทะเลปลอดเชื้อปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000g และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน ส่วนตัวอ่อนของปูทะเลกลุ่มควบคุมจำนวน 260 ตัว ปฏิบัติเหมือนกัน แต่แช่น้ำทะเลปลอดเชื้อแทน (Blank inoculation) หลังจากนั้นนำสัตว์ทดลองแช่ในน้ำตัวอย่างที่เตรียมไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้ออีก 2 ครั้ง จากนั้นแบ่งสัตว์ทดลองแต่ละชุดออกเป็น 3 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มพักเลี้ยงในอ่างพลาสติกที่มีการให้อากาศอุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 15 วัน บันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายลงในแต่ละกลุ่มและเก็บออกจากอ่างเพาะเลี้ยง สัตว์ทดลองที่ตายทั้งหมดจะถูกนำมาตรวจวินิจฉัยว่าได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวหรือไม่ โดยสกัด DNA จากเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์ทดลองและตรวจวิเคราะห์โดยใช้ two-step PCR และ *in situ* hybridization รวมทั้ง H&E staining ร่วมกัน ผลจากการทดลองพบว่าตัวอ่อนของปูทะเลที่แช่ในน้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือปนอยู่จะมีอัตราการตายสะสมสูงถึง 43% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายสะสมเพียง 20% เท่านั้น จากการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยเทคนิค PCR ทั้งในปูที่ใกล้จะตายและปูที่ยังมีชีวิตอยู่ บ่งชี้ว่า ไวรัสนี้เป็นสาเหตุของการตายของตัวอ่อนของปูทะเลมากที่สุด และจากการคัดเลือกตัวอย่างปูที่แช่ในน้ำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาวปนอยู่เป็นเวลา 2 ชั่วโมงมาเลี้ยงในภาวะปกติในเวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง และที่ 2 4 6 8 10 และ 12 วัน ซึ่งใกล้จะตายแบบสุ่มจากตัวอย่างปูแต่ละกลุ่ม นำมา fixed ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการตัดเนื้อเยื่อและผ่านกระบวนการต่างๆ สำหรับการศึกษาด้าน histology และย้อมด้วย H&E นอกจากนี้ยังนำเนื้อเยื่อที่เตรียมได้มา hybridization โดย DNA probe ที่ใช้นี้เตรียมจาก 146 bp PCR product ตามวิธีของ Lo; et al. (1996b: 215-225) ซึ่ง probe นี้ติดฉลากด้วย digoxigenin-dNTP (Boehringer mannheim Biochemical) โดยวิธี random priming method พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวที่พบในตัวอ่อนของปูทะเล (*S. serrata*) มีความชอบเนื้อเยื่อเหมือนกับที่พบในกุ้งทั่วไป คืออวัยวะภายนอก (External organs) เช่น เหงือก เปลือกหุ้มลำตัว และเซลล์ที่ติดเชื้อจะสลายตัว นอกจากนี้ยังตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวในอวัยวะอื่นๆ อีก ได้แก่ กระเพาะอาหาร ตับและตับอ่อน หัวใจ และเนื้อเยื่อประสาท โดยเฉพาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเนื้อเยื่อผิวหนังของอวัยวะเหล่านั้น

นาดาลา และคณะ (Nadala; & Lo, et al. 2000: 175 - 179) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหากุ้งที่ได้รับไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสโรคหัวเหลือง โดยวิธี dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays (DB-NC-EIA) โดยนำเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งขาวซึ่งมีน้ำหนักตัวประมาณ 40 - 60 กรัม มาบดใน phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) จากนั้นนำเนื้อเยื่อเหงือกที่บดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วไปตรวจหาไวรัสโดยใช้เทคนิค DB-NC-EIA นอกจากนั้นยังนำไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่แยกได้จากกุ้งชนิดต่างๆ มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคนี้ด้วย ได้แก่ไวรัสตัวแดงดวงขาวที่แยกได้จากกุ้งขาวในประเทศจีน อินโดนีเซีย สหรัฐอเมริกา และกุ้งครุมา (*P. japonicus*) จากประเทศญี่ปุ่น สำหรับการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสโรคหัวเหลือง กระทำดังนี้นำตัวอย่างที่บดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วมาหยดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหยด จากนั้นนำไปบ่มใน blocking solution (5% nonfat dry milk/PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้ายเมมเบรนไปบ่มใน rabbit anti - WSSV Ig - HRP (1 : 250 ใน 1% nonfat dry milk/PBS) ส่วนเมมเบรนอีกแผ่นหนึ่งย้ายไปบ่มใน rabbit anti - YHV Ig - HRP (1 : 500 ใน 1% nonfat dry milk/PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วล้างเมมเบรน 3 ครั้งๆ ละ 50 นาที ด้วย PBS - T (0.05% Tween - 20/PBS) จากนั้นเติม substrate เป็นเวลา 3 นาที หยุดปฏิกิริยาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้แห้งตรวจดูผลที่เกิดขึ้น พบว่า อัตราการเจอจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยใช้ anti - WSSV IgG-HRP คือ 1 : 250 ขณะที่อัตราการเจอจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสโรคหัวเหลือง โดยใช้ anti - YHV IgG-HRP คือ 1 : 500 และการใช้เทคนิค DB-NC-EIA สามารถตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสโรคหัวเหลืองในสารสกัดหยาบของตัวอย่างกุ้งชนิดต่างๆ ที่ได้รับไวรัสได้เป็นอย่างดีแม้ว่าจะมีอัตราการเจอจางเป็น 1 : 10 ก็ตาม ในทางตรงกันข้ามไม่พบไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสโรคหัวเหลืองในตัวอย่างสารสกัดหยาบของกุ้งปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ เมื่อตรวจหาด้วยวิธีการเดียวกัน จากผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาครั้งก่อนๆ ซึ่งตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค PCR และ Western blot ผลจากการทดลองที่ได้ในครั้งนี้ บ่งชี้ว่า เทคนิค DB-NC-EIA เป็นเทคนิคที่ไม่ต้องการตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์สูงก็สามารถตรวจพบได้เป็นเทคนิคที่ให้ผลเร็ว ประหยัดเวลา ง่าย และราคาถูก แต่ความไวในการตรวจหาไวรัสยังต่ำ และพบปฏิกิริยาข้ามกับเนื้อเยื่อปกติ การใช้กระบวนการทางภูมิคุ้มกันโดยผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีซึ่งใช้ไวรัสเป็นแอนติเจนนั้นมีประสิทธิภาพการใช้งานยังไม่ดีนัก เนื่องจากแอนติบอดียังคงแสดง non specific background ค่อนข้างสูงและมีความไวในการตรวจค่อนข้างต่ำ (Nadala; et al. 1997: 27 - 34, 2000: 175 - 179)

ซาฮู ฮาหมิด และคณะ (Hameed; et al. 2000: 207 - 213) ได้ศึกษาถึงความทนของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้วิธี immersion challenge การกินและการฉีดเข้ากล้ามเนื้อเพื่อตรวจสอบความไวของ *M. idella* , *M. lamerrae* และกุ้งก้ามกราม ในการติดเชื้อ

ไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยเปรียบเทียบการติดเชื้อนี้กับกึ่ง *P. indicus* และ *P. monodon* เมื่อใช้วิธี immersion challenge พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นสาเหตุการตายของ *M. lamerrae* และ *M. idella* 43.3% และ 53.3% ตามลำดับ เมื่อใช้วิธีกินทำให้เกิดการตายคิดเป็น 66.7% ใน *M. lamerrae* และ *M. idella* ไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดการตาย 100% ในกึ่ง *M. idella* , *M. lamerrae* และ *P. indicus* และ *P. monodon* เมื่อฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าสู่กล้ามเนื้อของสัตว์ ผลการทดลองแสดงความไวต่อการติดเชื้อของกึ่งทะเลและน้ำจืดต่อไวรัสชนิดนี้ยกเว้น *M. rosenbergii* ไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถก่อให้เกิดการตายโดยการชักนำการติดเชื้อโดยวิธีดังกล่าวในกึ่งก้ามกราม กลไกที่แน่นอนของความทนต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวของกึ่งก้ามกราม ยังไม่เป็นที่แน่ชัดในขณะนี้

พูลอส และคณะ (Poulos; et al. 2001) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์เป็นแอนติเจนสามารถผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน VP 28 จำนวน 4 โคลน ซึ่งแอนติบอดีเหล่านี้สามารถใช้ตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยวิธี dot blot , Western blot และตรวจการติดเชื้อในเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry และ immunofluorescence ได้ดี แต่แอนติบอดีเหล่านี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของไวรัสตัวแดงดวงขาวสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จาก จีน ไทย อินเดีย และปานามา

ต่อมาอนิล และคณะ (Anil; et al. 2002: 67 – 75) ก็ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้โดยใช้ไวรัสตัวแดงดวงขาวบริสุทธิ์เช่นกัน โดยผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนได้ 4 โคลน มีโคลนที่จำเพาะต่อ VP 28 และอีก 3 โคลน จับกับ VP28 และ VP18 (VP19 ในปัจจุบัน) แอนติบอดีทั้ง 4 สามารถใช้ตรวจสอบไวรัสตัวแดงดวงขาว ปริมาณ 500 พีโคกรัม โดยวิธี dot ELISA และสามารถตรวจสอบไวรัสในกึ่งที่ยังไม่แสดงลักษณะจุดขาวได้ด้วย

สำหรับการศึกษากันอย่างกว้างขวางถึงจีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้น แวน ฮูลเติน และคณะ (Van Hulten; et al. 2001a: 7 - 22) ได้ทำการศึกษาค้นพบว่าจีโนมของไวรัสตัวแดงดวงขาวประกอบด้วย 184 open reading frame และสามารถ identify ยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนโครงสร้างของไวรัส 5 ชนิดด้วยกัน คือ VP28 VP26 VP24 VP19 และ VP15 โดย VP26 VP24 และ VP15 เป็นองค์ประกอบของนิวคลีโอแคปซิด ส่วน VP28 และ VP19 เป็นส่วนประกอบของเปลือกหุ้มอนุภาคไวรัส (Van Hulten; et al. 2000b: 227 - 236 , 2000: 257 - 265 , Liu; et al. 2002: 11 - 18) และได้ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนส่วนเปลือกขนาด 28 kDa โดยทำการเพิ่มจำนวนยีน VP28 ซึ่งถอดรหัสเป็น โปรตีนส่วนเปลือกขนาด 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกึ่งกุลาคำที่ติดเชื้อ ซึ่งมีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศมาเลเซีย โปรตีนลูกผสม VP28 (r-28) ได้ถูกสร้างขึ้นโดย *E. coli* และนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการผลิตโมโน

โคลนอลแอนติบอดี โดยได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามชนิดที่ผลิตจากหนู (6F6, 6H และ 9C10) เมื่อตรวจสอบโดยวิธี Western blot พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับ โปรตีน VP28 ได้ 3 ตำแหน่ง ซึ่งไม่ทับตำแหน่งกันใน competitive ELISA ได้ ดังนั้นจึงได้พัฒนา antigen-capture ELISA (Ac-ELISA) สำหรับใช้ตรวจไวรัสนี้ โดย Ac-ELISA สามารถแยกความแตกต่างของกึ่งที่ติดไวรัส ตัวแดงดวงขาวจากกึ่งที่ไม่ติดเชื้อและได้นำไปยืนยันผลโดยวิธี PCR และ Western blot วิธี Ac-ELISA นี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างไวรัสตัวแดงดวงขาวความเข้มข้นโดยประมาณ 400 พิคोगราม และ r-28 ความเข้มข้นประมาณ 20 พิคोगราม ได้ซึ่งความไวในการตรวจสอบการติดเชื้อนี้เท่าเทียมกับ PCR แต่ไวกว่าวิธี Western blot ในการตรวจสอบไวรัสบริสุทธิ์ ตัวอย่าง haemolymph และเนื้อเยื่อที่ผ่านการบดที่เก็บจากแหล่งเพาะเลี้ยงกึ่งในมาเลเซียในระหว่างเดือนธันวาคม 2000 และกรกฎาคม 2001 ได้ถูกนำมาตรวจสอบด้วยวิธี Ac-ELISA และ PCR โดยได้ผลที่สอดคล้องกัน

ชัยวิสุทธางกูร และคณะ (Chaivisuthangkura; et al 2004) ได้ทำการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการนำยีนของโปรตีน VP28 (VP28F118 – โปรตีน VP28 ที่ปราศจากส่วน transmembrane) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนส่วนเปลือก (Envelope protein) ของไวรัสตัวแดงดวงขาวมาโคลนเข้าสู่ expression vector และนำเข้าสู่ *E. coli* สามารถสร้างโปรตีนลูกผสม (rVP28F118) และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดย SDS-PAGE สามารถผลิตโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงซึ่งนำไปฉีดให้หนูขาวสำหรับนำไปสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VP28 พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 7 โคลน โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้สามารถจับกับโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัสตัวแดงดวงขาวที่มีการติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry และ haemolymph โดยวิธี dot blot ทั้งสองวิธีนี้สามารถตรวจพิสูจน์ไวรัสตัวแดงดวงขาวในการทดลองการติดเชื้อโดยกึ่งกุลาดำได้ภายใน 12 ชั่วโมง โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความสะดวก รวดเร็ว เป็นชุดตรวจไวรัสที่ใช้ง่าย มีความจำเพาะและความไวสูงในราคาที่ไม่แพง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำเค็ม *P. serrifer* กุ้งฝอยน้ำจืด *M. lanchesteri* กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และกุ้งในวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ *Caridina* sp.

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำหรับ immunohistochemistry

1. กระบอกฉีดยา (Syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยา
2. อ่างเลี้ยงปูพร้อมอุปกรณ์การเลี้ยง
3. เครื่องมือผ่าตัด
4. ถังมือยาง
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. ขวดแก้วปากตรง (Vial)
7. จานเพาะเชื้อ (Petridish)
8. ขวดรูปกรวยมีแขน (Suction flask)
9. โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (Coplin jar)
10. ตะกร้าสำหรับย้อมสไลด์ (Slide basket)
11. สไลด์ (Slide) พร้อมกระจกปิดสไลด์ (Cover slide)
12. เครื่องปั๊มดูดอากาศ (Suction pump) พร้อมอุปกรณ์
13. ไมโครปิเปตพร้อมทิป (Micropipette and tip)
14. ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง (Freezer)
15. ตู้ดูดควัน (Chemical fume hood)
16. ตู้อบ (Hot air oven)
17. แท่นอุ่นสไลด์ (Slide warmer)
18. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome)
19. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (Light microscope)
20. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

อุปกรณ์สำหรับ PCR

1. โกร่งเคลือบสำหรับบดเนื้อเยื่อผ่านการฆ่าเชื้อ
2. หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. หลอด Thin wall สำหรับ PCR
4. เครื่อง Electrophoresis apparatus และ อุปกรณ์
5. เครื่อง Ultraviolet transilluminator (Spectroline)
6. เครื่อง Microwave oven (Turbora)
7. เครื่องเขย่าผสมสาร (Shaker)
8. เครื่อง Thermal cycler (Eppendorf)
9. กล้อง Polaroid (Gelcam) พร้อมฟิล์ม
10. เครื่องชั่งสาร
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
12. Collecting tube

สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1. เอทานอล (Ethanol) 70%, 80%, 90% และ 95%
2. บิวทานอล (Butanol)
3. ไซลีน (Xylene)
4. Phosphate buffer saline (PBS) 0.1 M pH 7.2 (วิธีการเตรียมดูภาคผนวก ก)
5. สารละลาย P_1^+ (10% Calf bovine serum):PBS (1:1) (วิธีการเตรียมดูภาคผนวก ข)
6. ไดอะมินobenซีนดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)
7. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2) 30%
8. สีย้อมอีออสิน (Eosin) 0.02% ในเอทิลเอทานอล 95%
9. สีย้อมมาทอกไซลีน (Hematoxylin)
10. พาราพลาสต์ (Paraplast plus paraffin)
11. สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution)
12. น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH)

14. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

15. ตัวกลางผนัง (Permunt)

16. น้ำกลั่น

17. แอนติบอดีสำหรับตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาว

แอนติบอดีตัวแรก (First antibody) ได้แก่

โมโนโคลนอลแอนติบอดี W10 ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein VP19 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

โมโนโคลนอลแอนติบอดี W17 ซึ่งจำเพาะต่อ nucleocapsid VP26 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (Chaivisuthangura et al., 2004)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ซึ่งจำเพาะต่อ capsid protein p20 ของไวรัสหัวเหลือง (Sithigorngul et al., 2002)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein gp116 ของไวรัสหัวเหลือง (Sithigorngul et al., 2000)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี TSV-3 ซึ่งจำเพาะต่อ capsid protein VP3 ของไวรัสทอรา (Longyant et al., submitted)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสเอชพีวี (Rukpratanporn et al., 2005)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี MBV 5-3 H ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสเอ็มบีวี (Boonsanongchoking et al., 2006)

แอนติบอดีตัวที่สอง (Second antibody) ได้แก่

Goat anti-mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) Bio-Rad

18. เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

19. อาหารเม็ดเลี้ยงกุ้ง

สารเคมีสำหรับวิธี PCR

รายการที่ 1 – 5 นำมาจากชุดทดลอง high pure viral nucleic acid kit Cat no.1858874 ของบริษัท Roche Molecular Biochemicals

1. Working solution

2. Proteinase K
3. Inhibitor removal buffer
4. Washing buffer
5. Elution buffer
6. 10 x PCR buffer (Promega)
7. DNA polymerase (*Taq* DNA polymerase: Promega)
8. Primer 28F และ primer 28R จาก BSU
9. Lysis buffer
10. 1X TBE buffer
11. เจล Agarose (Promega)
12. Blue/Orange 6x Loading dye (Promega)
13. 1 kb plus DNA marker (Bio-Rad)
14. Ethidium bromide (Bio-Rad)
15. Isopropanol (Merck)
16. 25 mM MgCl₂ (Promega)
17. dNTP (Promega)

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงกุ้ง
2. การจำแนกชนิดของกุ้ง
3. การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
4. การวางแผนการทดลอง
5. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงกุ้ง

นำตัวอย่างกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* จากอำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา กุ้งฝอยน้ำเค็ม *P. serrifer* จากอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี กุ้งฝอยน้ำจืด *M. lanchesteri* และกุ้งกะปิ *Caridina* sp. จากอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ อย่างละ

ประมาณ 100 ตัว นำมาเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ที่อุณหภูมิห้องและแสงธรรมชาติ โดยเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มเท่ากับแหล่งที่นำมาจากธรรมชาติ

2. การจำแนกชนิดของกุ้ง

บันทึกภาพกุ้งที่นำมาเลี้ยงเพื่อเก็บเป็นข้อมูลเกี่ยวกับสีและรูปร่างตามธรรมชาติของกุ้ง บันทึกรายละเอียดสถานที่และวันที่เก็บ จากนั้นเปรียบเทียบลักษณะตามอนุกรมวิธาน โดยอ้างอิงจากวิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนิในประเทศไทยของ พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล (2532)

3. การเตรียมไวรัสตัวแดงดวงขาว

เก็บฮีโมลิมพ์ (Haemolymph) จากกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรงนำมาปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนของเม็ดเลือด (Haemocyte) ออกไปกรองฮีโมลิมพ์ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ให้นำไปเจือจางด้วยสารละลาย 2X PBS ในอัตราส่วน 1 : 500

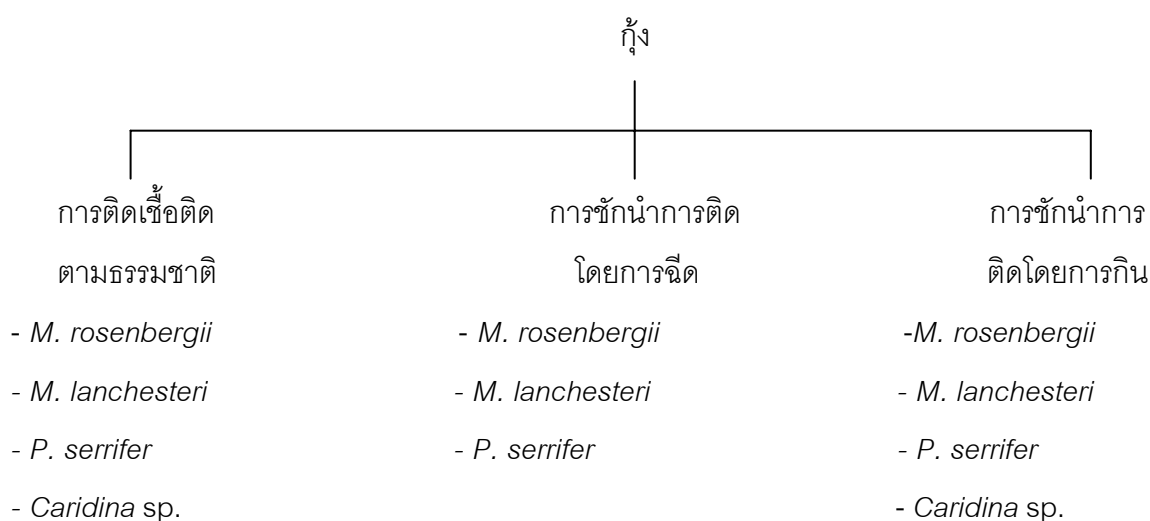
4. การวางแผนการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

4.1 การตรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งที่ติดเชื้อในธรรมชาติโดยสุ่มตัวอย่างกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำเค็ม *P. serrifer* กุ้งฝอยน้ำจืด *M. lanchesteri* กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และกุ้งในวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกบ *Caridina* sp. จากแหล่งเพาะเลี้ยงในวันเดียวกับที่นำตัวอย่างมา เพื่อตรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ติดมาตามธรรมชาติ

4.2 การทดลองการติดเชื้อโดยการฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าสู่กุ้งโดยฉีดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เจือจางในสารละลาย 2XPBS 1 : 500 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เข้าสู่กุ้งก้ามกรามจำนวน 100 ตัว จากนั้นทำการเลี้ยงโดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เก็บตัวอย่างกุ้งในวันที่ 1, 3, 10 และ 30 อย่างน้อยครั้งละ 15 ตัว รวมทั้งตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยอย่างรุนแรงและใกล้ตายในระหว่างการทดลอง เพื่อตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

4.3 การทดลองการติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่มีไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยนำตัวอย่างกุ้งชนิดละประมาณ 100 ตัว มาเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 1 เดือน และให้เนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อเป็นอาหารตลอดช่วงเวลาของการทดลอง จากนั้นทำการตรวจสอบการติดเชื้อโดยการเก็บตัวอย่าง ในวันที่ 1 3 10 และ 30 อย่างน้อยครั้งละ 15 ตัว รวมทั้งตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยอย่างรุนแรงและใกล้ตายในระหว่างการทดลอง เพื่อตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว



ภาพประกอบ 1 แสดงการทดลองการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ่มชนิดต่างๆ

5. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

สลับกุ่มในน้ำเย็นจัดตัดส่วนของขาและเปลือกหุ้มออก ตัดแบ่งส่วนเนื้อและส่วนที่มีอวัยวะออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กันตามความยาวของลำตัว ส่วนหนึ่งเก็บในหลอดที่มี lysis buffer ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดลองตามข้อ 5.1 อีกส่วนหนึ่งแช่ในหลอดที่มี Davidson's fixative อย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองตามข้อ 5.2

5.1 การตรวจไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR

ขั้นตอนการทำ PCR เริ่มจากการสกัด DNA จากตัวอย่าง โดยใช้วิธีการตามที่ระบุไว้ในชุดสกัด DNA ของไวรัส high pure viral kit Cat no. 1858874 ของบริษัท Roche Molecular Biochemicals

5.1.1 ขั้นตอนการสกัด DNA จากกุ่มตัวอย่าง

(1) นำเนื้อเยื่อกุ่มมาบดใน lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% SDS) ประมาณ 40 มิลลิลิตร ด้วยโกร่งเคลือบ เนื้อเยื่อที่บดละเอียดแล้วเทใส่ในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแบ่ง supernatant ใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 200 ไมโครลิตร แล้วผสมกับ working solution [2.5 มิลลิลิตร binding buffer, 50 ไมโครลิตร poly(A)] ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเติม proteinase K ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(2) เติม isopropanol ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

(3) ประกอบหลอด high pure spin filter กับ high pure collection เข้าด้วยกัน

จากนั้นเติมตัวอย่างลงในหลอดด้านบน นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งหลอด high pure collection รวมทั้งส่วนใส

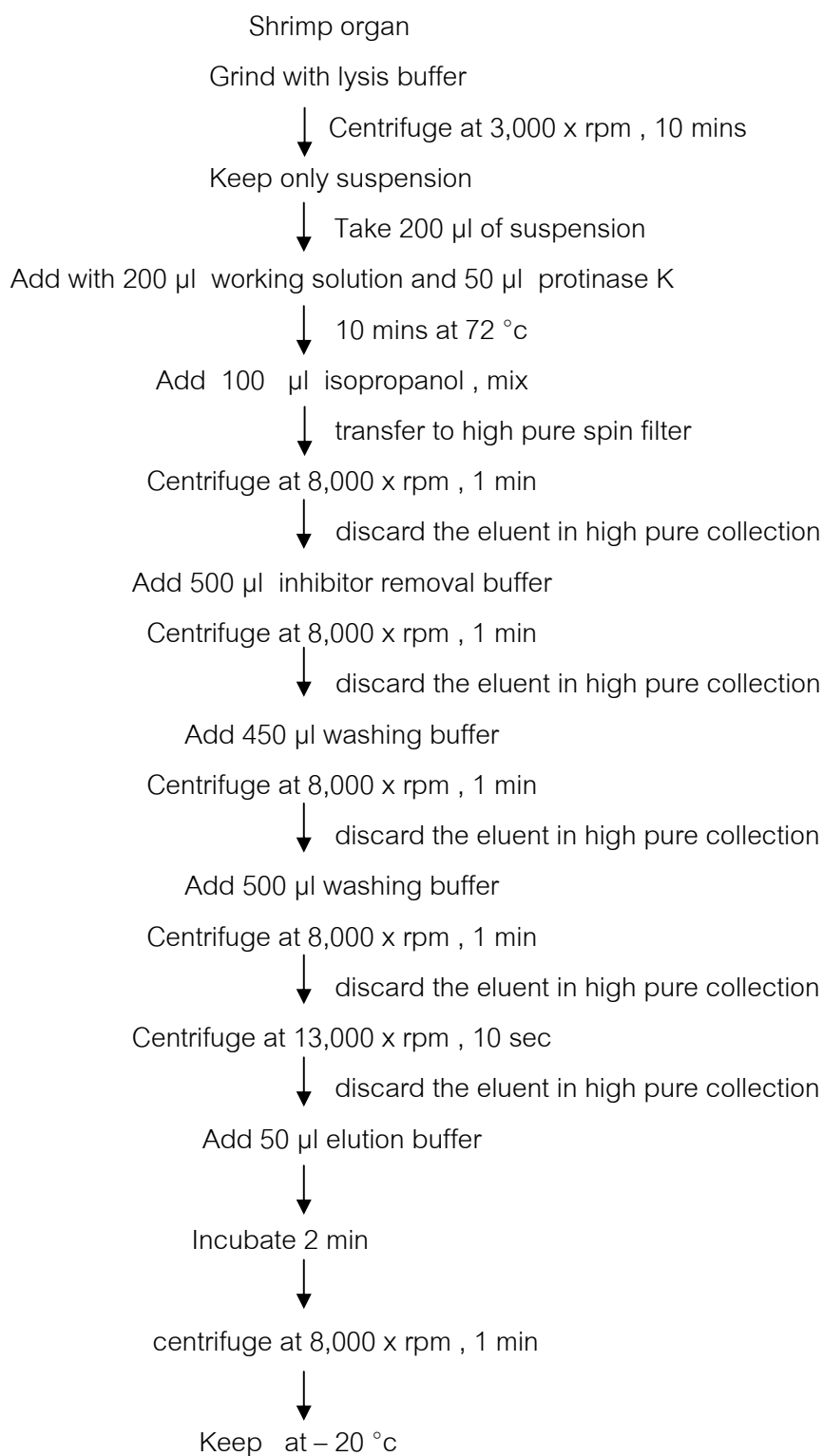
(4) ประกอบหลอด high pure collection ขึ้นใหม่กับ high pure spin filter เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม inhibitor removal buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในส่วนผสม นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเปลี่ยนหลอด high pure collection เป็นหลอดใหม่

(5) ล้างส่วนผสมในหลอด high pure spin filter โดยเติม washing buffer ปริมาณ 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยนหลอด high pure collection จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้งหนึ่ง โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

(6) นำหลอด high pure spin filter ที่ได้จากการล้าง 2 ครั้งด้วยสารละลาย washing buffer นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยนหลอด high pure collection

(7) ประกอบหลอด high pure spin filter กับหลอด microcentrifuge เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่ม 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

(8) เก็บ DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



(high pure viral nucleic acid kit, 2001)

ภาพประกอบ 2 ขั้นตอนการสกัด DNA

5.1.2 ขั้นตอนการทำ PCR

หลักการของ PCR ใช้หลักพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอภายใต้สภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วนของ DNA ใดๆ โดยมีขั้นตอนหลักดังนี้

(1) ผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR แล้วแบ่งใส่ในหลอด thin wall ขนาดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดังนี้

DNA ของไวรัสที่สกัดได้จาก 5.1.1	2.5	ไมโครลิตร
10 x PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	2	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	2	ไมโครลิตร
Primer VP 28F	1	ไมโครลิตร
Primer VP28R	1	ไมโครลิตร
DNA polymerase (Promega)	0.25	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	13.75	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

(2) นำเข้าเครื่อง thermal cycle (Eppendorf) ที่ปรับอุณหภูมิและเวลาให้เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการดังแสดงในตารางที่ 1

ตาราง 1 แสดงอุณหภูมิ ระยะเวลา และจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนการทำงานของปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน ที่	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที : วินาที)	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที : วินาที)	จำนวน รอบ
1	94	4:00					1
2	94	00:15	55	00:30	72	00:45	35
3	72	10:00					1
4	4	-					1

ก่อนขั้นตอนการทำ PCR ควรทำการแยกสาย DNA เป็นสองสายโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที เพื่อให้สาย DNA ที่มีความยาวมากแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ขั้นตอน PCR เริ่มจากการแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส (Denaturation step)

สาย DNA จะแยกออกจากกันเป็น 2 สาย ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่ primer จะเข้าไปจับที่ตำแหน่งเฉพาะบนสาย DNA (Annealing step) และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส (Elongation step) เอนไซม์ DNA polymerase ทำงานได้ดีโดยจะเร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าไปที่ปลาย 3' ของ primer ทำให้เกิดการจำลองสาย DNA เส้นสั้นๆ (PCR product) ที่สมบูรณ์ เมื่อทำปฏิกิริยา 35 รอบจะได้ PCR product ปริมาณมาก หลังจากนั้นบ่ม PCR product ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Final extension) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ก่อนการเก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

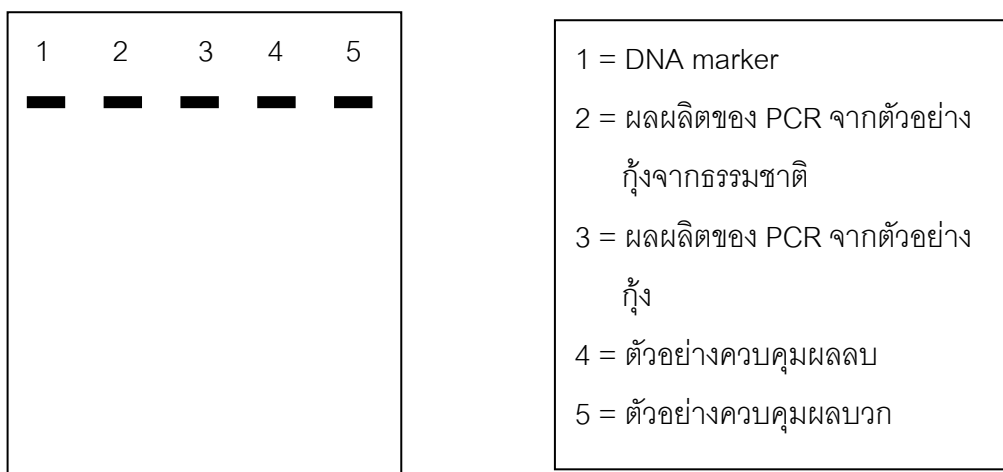
หมายเหตุ ในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องมีตัวควบคุม เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการปฏิบัติและตรวจสอบความสามารถในการทำปฏิกิริยาของสารเคมีที่ใช้ ตัวควบคุมมี 2 แบบ คือ ตัวควบคุมผลบวก (Positive control) ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ฮีโมลิมพ์ (Haemolymph) ของกิ้งกูดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ใช้เพื่อตรวจสอบสารเคมีและปฏิกิริยา และตัวควบคุมผลลบ (Negative control) ใช้น้ำกลั่นหรือ DNA จากกิ้งกูดำที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน

5.1.3. การตรวจผลโดยวิธี Agarose-gel electrophoresis

(1) เตรียมเจล agarose โดยชั่งผงเจลปริมาณ 0.6 กรัม ละลายใน 1X TBE buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ความร้อน จากนั้นรอให้เย็นลง เติมเอทีดีเอ็ม โบรไมด์ 2.5 ไมโครลิตร เทลงไปในถาดเตรียมเจลพร้อมเสียบแผ่นหัวพลาสติก (Comb) ให้เกิดเป็นร่องสำหรับใส่ตัวอย่าง ทั้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

(2) ผสมตัวอย่างที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) กับสี Blue/Orange (6x Loading dye) ในอัตราส่วน 1 : 6

(3) นำเจลที่แข็งตัวแล้วจัดลงในเครื่อง electrophoresis จากนั้นเติมสารละลาย 1X TBE buffer จนท่วมเจล แล้วหยอด PCR product ที่ได้จากกิ้งกูดำ ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก และตัวควบคุมผลลบ ลงในไปร่องเจล รวมทั้งหยอด DNA marker เพื่อใช้ในการบอกขนาดของชิ้น PCR product ดังภาพประกอบที่ 3



ภาพประกอบ 3 แสดงตัวอย่างผลของ agarose gel electrophoresis

(5) เมื่อหยุดตัวอย่างครบแล้ว ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 110 โวลต์ เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ครึ่ง หลังจากนั้นนำเจลไปวางบนเครื่อง ultraviolet transilluminator เพื่อดูผลที่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพบันทึกผล

5.2 การตรวจไวรัสตัวแดงขาวด้วยวิธี immunohistochemistry

5.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อทางมิชวิทยา

(1) นำตัวอย่างกึ่งที่ทดลองที่เก็บจากบ่อมาล้างให้สะอาด สลับในน้ำเย็นจัดตัดส่วนหัวและผ่ากึ่งกลาง แกะเปลือกออก ตัดระยะครึ่งส่วนขาเดินออก

(2) นำเอาส่วนหัวที่ผ่าไปทำให้คงรูป (Fix) ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(3) นำเนื้อเยื่อมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้ น้ำยาคงรูปออก

(4) ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydrate) ด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน และนอร์มัลบิวทิลทานอลตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (Infiltrate) ด้วยพาราฟลาสต์ ดังนี้

- แห้ในเอทานอล 70% 90% ครั้งละ 3 ชั่วโมง
- แห้ในเอทานอล 95% 2 ครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- แห้ในนอร์มัลบิวทิลทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- แห้ในนอร์มัลบิวทิลทานอลที่ผสมกับไซลีน ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- แห้ในไซลีน 1 ชั่วโมง

-แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราฟลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บในตู้อบ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

-แช่ในพาราฟลาสต์หลอมเหลว จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 30 นาที

(5) นำเนื้อเยื่อที่อินฟิลเตรทด้วยพาราฟลาสต์แล้วไปฝัง (Embed) ในพาราฟลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม

(6) ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน เรียงต่อกัน (Serial section) เป็นริบบิ้น (Ribbon)

(7) นำเซกชัน (Section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถว ตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชันไปวางบนหยดน้ำ 1 แถว มี 3 เซกชัน ทำ 1 แถวต่อ 1 สไลด์ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแห้งดีไม่มีการซ้อนทับกันของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกขับให้แห้ง จะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงบนสไลด์ แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.2 กระบวนการย้อมโดยวิธีอินไดเรกต์อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (Indirect peroxidase immunohistochemistry) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวคือ W10 W17 W29 และโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดอื่นๆ ได้แก่ MBV5-3H V3-2B Y19 TSV3 และ HPV16-9C เพื่อตรวจการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นด้วย

(1) นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราฟลาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (Deparaffination) โดยวางสไลด์ลงในตะกร้า (Slide basket) แล้วจุ่มลงในโถแก้ย้อมสไลด์โดยแช่ใน

- ไซลีนที่ 1 เป็นเวลา 10 นาที
- ไซลีนที่ 2 และ 3 เป็นเวลา 5 นาที

(2) เติมน้ำ (Hydration) เข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่างๆ กันโดยแช่ใน นอร์มัลบิวทานอลเป็นเวลา 5 นาที

แช่ในเอทานอล 95% 90% 80% และ 70 % ครั้งละ 5 นาที

(3) ล้างเซกชันด้วยน้ำกลั่นตามด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที

แช่ในสารละลายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที

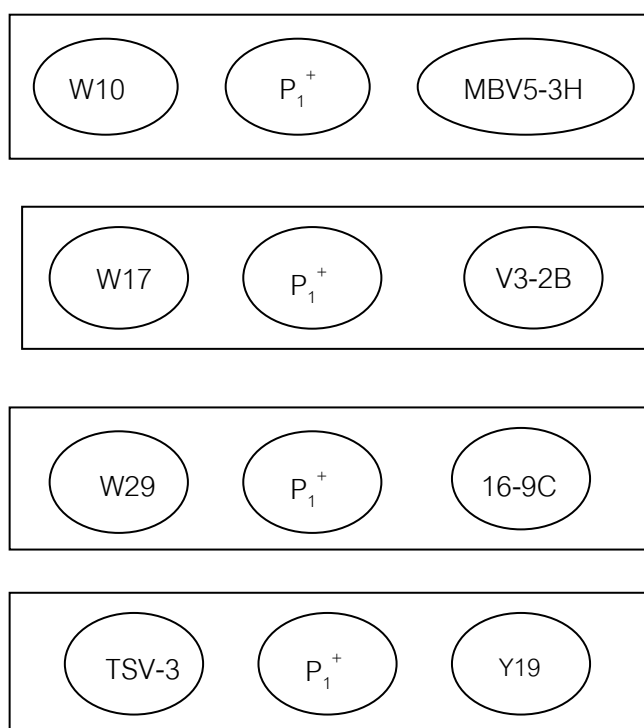
ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที

ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

(4) การใส่แอนติบอดีตัวที่หนึ่ง

นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) แล้วหยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเซลล์ด้วยไมโครปิเปต นำไปเก็บไว้ในที่ชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซลล์จนออก ยกเว้นเซลล์ชั้นที่ 2

หยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ให้คลุมเซลล์ชั้นที่ 1 และ 3 โดยแอนติบอดีที่ใช้ คือ ที่เซลล์ชั้นที่ 1 ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W10 หรือ W17 หรือ W29 หรือ TSV-3 ที่เซลล์ชั้นที่ 3 ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีหรือ MBV5-3H หรือ V3-2B หรือ HPV16-9C หรือ Y19 โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดเจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1 : 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ 4 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง

(5) การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง

ล้างแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ออกจากเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้ว

แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที จากนั้นนำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ

หยดแอนติบอดีที่สอง ได้แก่ Goat anti mouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P_1^+ อัตรา 1 : 1000 ในทุกเซกชัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างแอนติบอดีตัวที่สอง ออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

(6) นำเซกชันมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 3,3'-ไดอะมีโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (DAB) 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซกชันด้วยน้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

(7) ย้อมด้วยสีอีมาทอกไซลีน

(8) ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 70% 80% 90% และ 95% ครั้งละ 5 นาที

(9) ย้อมทับด้วยสีอีโอซิน 0.02% ในเอทานอล 95% ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทานอล 95%

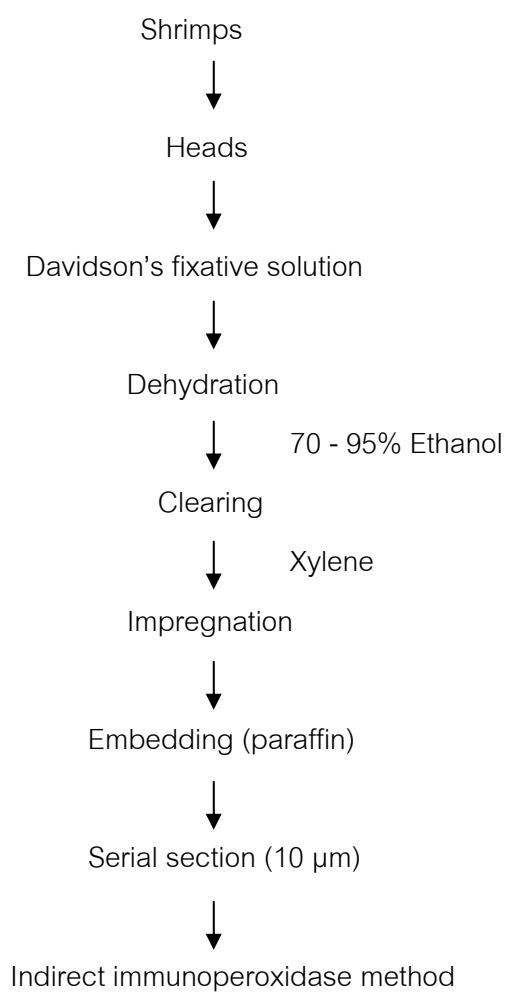
(10) นำเซกชันมาดึงน้ำออกโดยผ่าน

นอร์มัลบิวทานอลเป็นเวลา 5 นาที

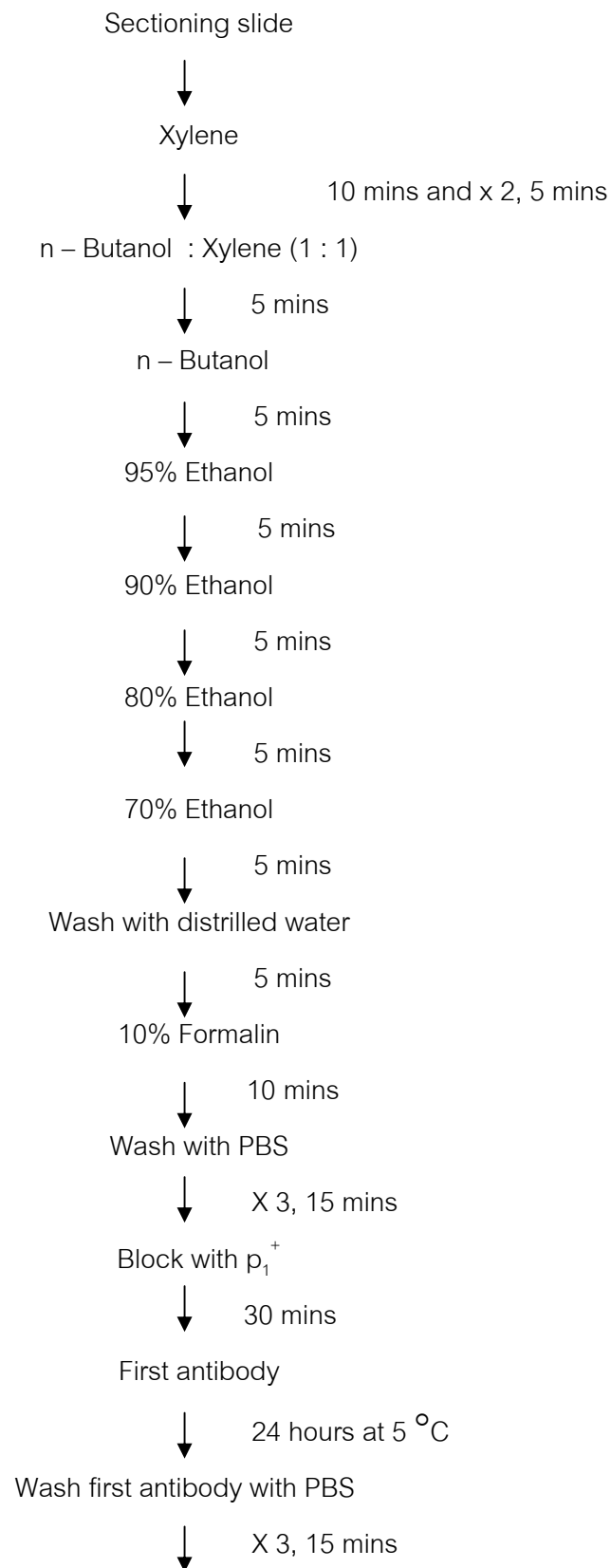
นอร์มัลบิวทานอลที่ผสมกับไซลีน ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 5 นาที

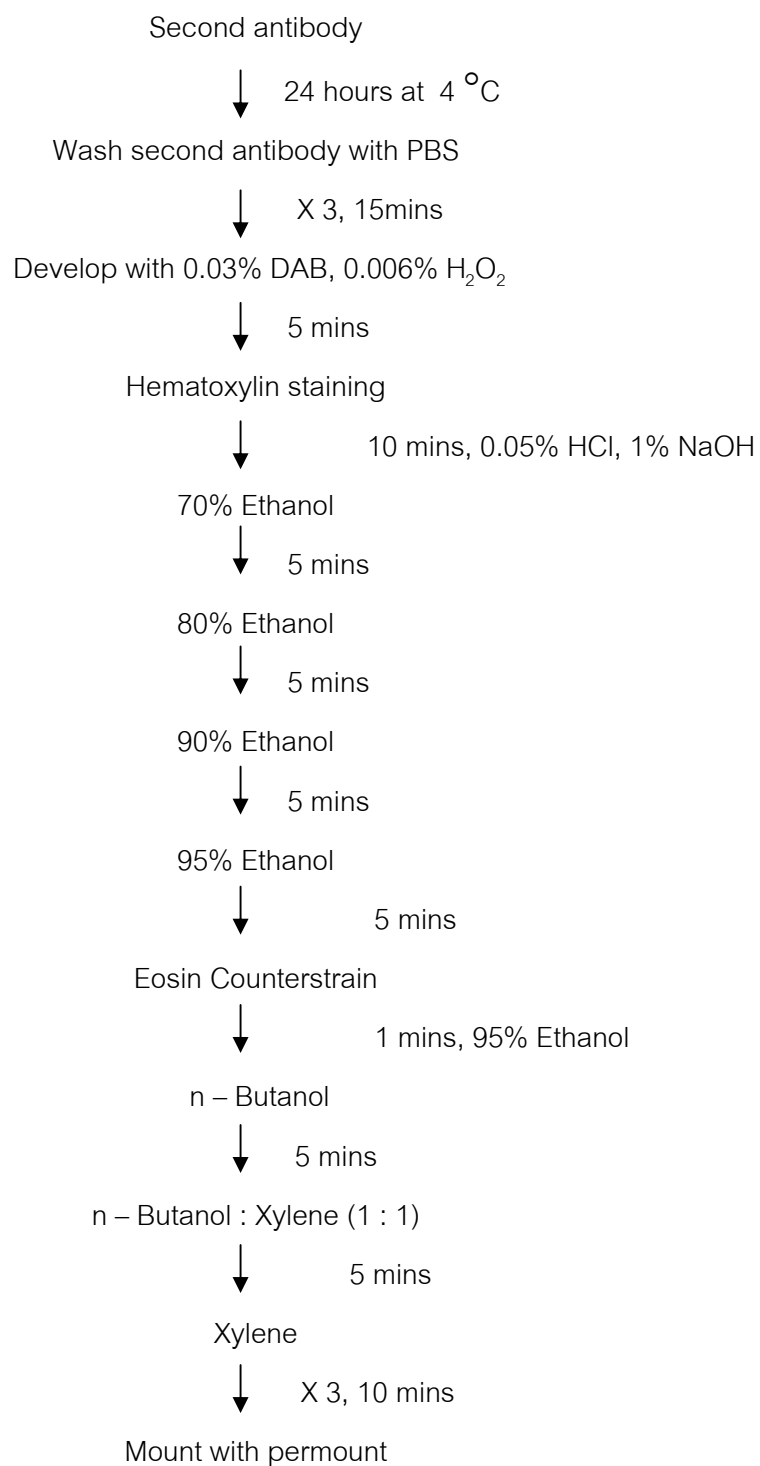
ไซลีน จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

(11) ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการฉีกสไลด์ (Mount) ด้วยตัวกลางฉีก (Permount) จากนั้นจึงนำสไลด์ที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ทำโดยการฉีกสไลด์ (Mount) โดยหยดเปอร์แมท์ (Permount) ประมาณ 3 หยด บนสไลด์ นำกระจกสไลด์มาปิดโดยแตะขอบด้านหนึ่งเพียงทำมุม 45 องศา แล้วค่อยๆ วางลง โดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตจากการติดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในบริเวณต่างๆ ของเนื้อเยื่อ

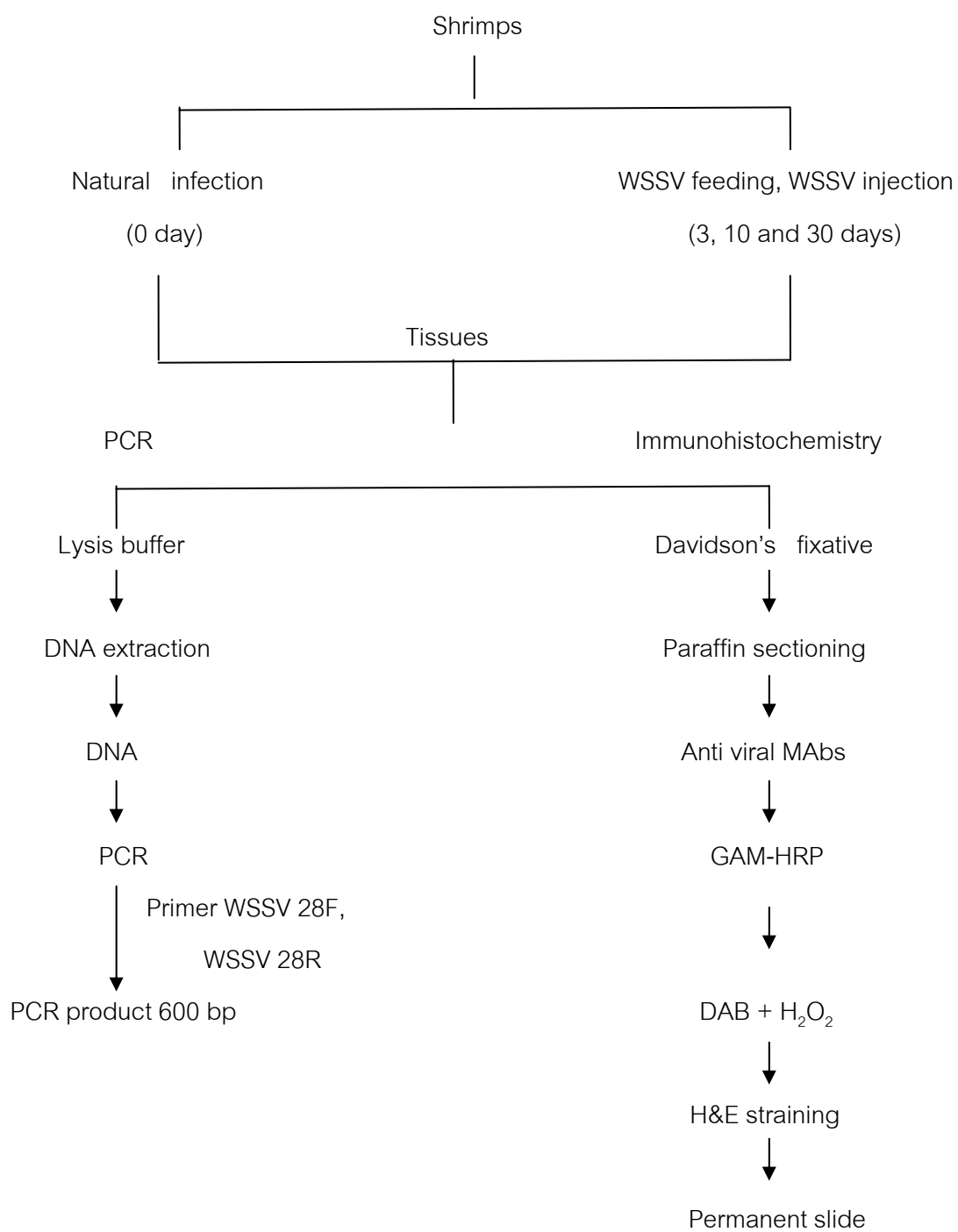


ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology





ภาพประกอบ 6 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อกุ้งโดยวิธีอินไดเรคติมมูโนเปอร์
ออกซิเดส



ภาพประกอบ 7 สรุปแนววิธีทดลอง

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. จำแนกชนิดตัวอย่างกึ่งที่ใช้ในการทดลอง
2. ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติ และจากการทดลองการทำให้ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งด้วยวิธี PCR
3. ตรวจดูการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของอวัยวะต่างๆ ภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อในสัตว์ชนิดต่างๆ ในแต่ละวงศ์
4. ตรวจหาและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวภายในเนื้อเยื่อ จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W10 W17 และ W29 และ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสชนิดอื่น เช่น Y19 V32B TSV-3 HPV16-9C และ MBV5-3H
5. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว
6. นำเสนอข้อมูลด้วยภาพและตาราง

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้ง

จากการเก็บรวบรวมกุ้งในวงศ์ต่างๆ จากแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ แหล่งน้ำตามธรรมชาติและชายฝั่งทะเลป่าชายเลนในอำเภอสุมทรีบุรีรัมย์ จังหวัดสุรินทร์ และอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และอำเภอสุมทรีบุรีรัมย์ จังหวัดสุรินทร์ นำมาตรวจดูลักษณะต่างๆ เช่น กะโหลก (carapace) แผ่นก้ามบังหนวด ขาเดิน หาง แพนหาง และสีลำตัว เป็นต้น โดยเทียบกับหนังสือ FAO species Catalogue Vol. 1 Shrimps and Prawns of the World ของ Holthuis (1980) วิทยานิพนธ์เรื่อง การกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา ของกัลยาณี ยงจินดารัตน์ (2531) วิทยานิพนธ์เรื่อง อนุกรมวิธานของกุ้งฟีนอยในประเทศไทย ของนงนุช ลีลาปิยะนาถ (2532) วิทยานิพนธ์เรื่อง อนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนิโคในประเทศไทย ของพิมลวรรณ ลีละยวัฒน์กุล (2518) และวิทยานิพนธ์ เรื่อง การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี ของยัยนั๊บ แวและ (2545) สามารถพิสูจน์ทราบชนิดต่างๆของกุ้งได้ดังนี้

1.1 วงศ์ Palaemonidae สามารถจำแนกกุ้งที่รวบรวมได้ออกเป็น 2 สกุล (Genus) 3 ชนิด (Species) คือ

กุ้งฝอยน้ำเค็ม *P. serifer* พบมากในป่าชายเลน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำเค็ม กุ้งมีลักษณะตรงตอนปลายบนชันเล็กน้อย ลำตัวใสไม่มีขาเดินคู่ที่ 2 ยาวเท่ากัน ผิวโดยรอบมีลายประสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 8)

กุ้งฝอยน้ำจืด *M. lanchesteri* พบมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอสุมทรีบุรีรัมย์ และในบ่อน้ำจืด อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำจืด กุ้งมีลักษณะตรงและยาวพอดีกับปลายของแผ่นก้ามบังหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวเรียวและมีส่วนของก้ามหนึบยาวเลยปลายของกรือลำตัวใสไม่มีสี (ภาพประกอบ 9)

กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* พบมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอสุมทรีบุรีรัมย์ จังหวัดสุรินทร์ และบางส่วนซื้อจากตลาดกลาง อำเภอสุมทรีบุรีรัมย์ จังหวัดสุรินทร์ ลักษณะของกุ้งก้ามกราม กุ้งส่วนโคนที่อยู่เหนือตาโค้งงอขึ้นและส่วนปลายเรียวบนชัน ขาเดินคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่และยาวไม่เท่ากัน ผิวด้านนอกของขาเดินมีหนามแหลมเรียงอยู่กระจัดกระจาย นิ้วของก้ามหนึบเคลื่อนไหวได้ มีขนปกคลุมอย่างหนาแน่น (ภาพประกอบ 10)

1.2 วงศ์ Atyidae สามารถรวบรวมได้ 1 สกุลคือ

กุ้งกะปิ *Caridina* sp. พบมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งกะปิ กี่เรียบหรือมีฟัน ไม่มีหนามเหนือเบ้าตา มีหนามด้านข้างของ carapace ขาดินคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 มีลักษณะเป็นก้ามหนีบ บริเวณส่วนปลายของนิ้วทั้งสองมีขนเป็นพู่ (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*)



ภาพประกอบ 9 ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*)



ภาพประกอบ 10 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)



ภาพประกอบ 11 ลักษณะของกุ้งกะปิ (*Caridina* sp.)

2. การตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี PCR

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งในวงศ์ Palaemonidae และวงศ์ Atyidae ที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติและจากการทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR ไม่พบการติดเชื้อในกุ้งทั้ง 2 วงศ์ (ตาราง 2 และภาพประกอบ 12 16 19 และ 22) สำหรับการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งในวงศ์ Palaemonidae 3 ชนิดที่ฉีดด้วย haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 10 15 และ 30 วัน พบว่า กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) มีการติดเชื้อตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงวันที่ 15 หลังจากการฉีดเชื้อ (ภาพประกอบ 12) ส่วนในกุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) และกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 3 และ 10 แต่ในวันที่ 15 และ 30 ไม่พบการติดเชื้อ (ภาพประกอบ 16 และ 19) (ตาราง 3)

3. การตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี immunohistochemistry

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 26 และ 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) กุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติและจากการทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งทั้ง 3 ชนิด ทั้งที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติและจากการทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ส่วนกุ้งในวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกระปิ (*Caridina* sp.) นั้นไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเช่นเดียวกัน (ภาพประกอบ 23) (ตาราง 2)

การตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งที่ทดลองด้วยการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กับกุ้งวงศ์ Palaemonidae เป็นเวลา 3 10 15 และ 30 วัน พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งวงศ์ Palaemonidae ทั้ง 3 ชนิด (ตาราง 3) โดยพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ เช่น เหงือก เนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก อวัยวะน้ำเหลือง ตับ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รัยางค์ ขาว่ายน้ำ และกล้ามเนื้อ โดยในกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) พบว่ามีการติดเชื้อจำนวนมากในอวัยวะต่างๆ ในวันที่ 3 หลังจากการฉีดเชื้อ แต่ในวันที่ 10 และ 15 จำนวนกุ้งที่มีการติดเชื้อจะลดลงและมีการติดเชื้อน้อยลงด้วย (ภาพประกอบ 13 14 และ 15) สำหรับในกุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) และกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) พบว่ามีจำนวนกุ้งทั้ง 2 ชนิดที่มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวน้อยตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากการฉีดเชื้อ และลดลงจนไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 10 15 และ 30 วันตามลำดับ (ภาพประกอบ 17 18 20 และ 21) (ตาราง 3)

สำหรับการตรวจการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น ไวรัสหัดเหลือง ไวรัสทอรา ไวรัสเอชพีวี และไวรัสเอดส์ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสเหล่านี้ในกึ่งที่เก็บรวบรวมจากธรรมชาติ และกึ่งที่ทดลอง ไม่พบการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆในตัวอย่างที่ใช้ทดลอง

ตาราง 2 แสดงชนิดของกุ้งที่เก็บจากแหล่งต่างๆ และนำมาชักนำให้กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่างๆ

วงศ์และ species	แหล่งที่เก็บ ความเค็มน้ำทะเล (ppt)	วิธีการตรวจ WSSV	Natural infection 0 วัน	การตรวจเชื้อหลังได้รับ WSSV (วัน)				หมายเหตุ
				3	10	15	30	
Palaemonidae 1. กุ้งฝอยน้ำเค็ม (<i>Palaemon serrifer</i>)	ต.อ่างศิลา จ.ชลบุรี 25 ppt	PCR	-(15)	-(15)	-(15)	-(15)	ND	
		IHC	-(15/15)	-(15/15)	-(15/15)	-(15/15)	ND	
2. กุ้งฝอยน้ำจืด (<i>Macrobrachium lanchesteri</i>)	อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ 10 ppt	PCR	-(15)	-(15)	-(15)	-(15)	-(12)	
		IHC 1	-(15/15)	-(15/15)	-(15/15)	-(15/15)	-(12/12)	
3. กุ้งก้ามกราม (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	อ.พระนครศรีอยุธยา จ.พระนครศรีอยุธยา 5 ppt	PCR	-(15)	-(15)	-(15)	-(15)	-(7)	
		IHC 1	-(15/15)	-(15/15)	-(15/15)	-(15/15)	-(7/7)	
		IHC 2	-(15/15)	-(15/15)	-(15/15)	-(15/15)	-(8/8)	
Atyidae กุ้งก้ามกราม <i>Caridina</i> sp.	ต.บางปลา อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ 5 ppt	PCR	-(30)	-(30)	-(30)	-(20)	-(10)	
		IHC 1	-(30/30)	-(30/30)	-(30/30)	-(20/20)	-(10/10)	

IHC = Immunohistochemistry การตรวจเนื้อเยื่อต่างๆ จากตัวอย่างกุ้งทุกตัว

PCR = Polymerase Chain Reaction ทำการตรวจตัวอย่างกุ้งในแต่ละกลุ่มรวมกัน

ND = Not determined

- = ไม่ติดเชื้อ

± = ติดเชื่อน้อยมาก

+ = ติดเชื้อชัดเจนปริมาณต่างๆ

ตาราง 3 แสดงชนิดของกุ้งที่เก็บจากแหล่งต่างๆ และนำมาชักนำให้กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจที่ระยะเวลาต่าง ๆ

วงศ์และ species	แหล่งที่เก็บ ความเค็ม น้ำทะเล (ppt)	วิธีการ ตรวจ WSSV	Natural infection 0 วัน	การตรวจเชื้อหลังได้รับ WSSV (วัน)				หมายเหตุ
				3	10	15	30	
Palaemonidae 1. กุ้งฝอยน้ำเค็ม (<i>Palaemon serrifer</i>)	ต.อ่างศิลา	PCR	-(15)	++(15)	+(15)	+(15)	ND	
	จ.ชลบุรี	IHC 1	-(15/15)	++(8/15)	+(8/15)	+(5/15)	ND	
	25 ppt	IHC 2	-(15/15)	++(13/15)	+(10/15)	+(8/15)	ND	
2. กุ้งฝอยน้ำจืด (<i>Macrobrachium lanchesteri</i>)	อ.พระสมุทรเจดีย์	PCR	-(15)	+(15)	±(15)	-(15)	-(12)	
	จ.สมุทรปราการ	IHC 1	-(15/15)	+(7/15)	±(1/15)	ND	ND	
	10 ppt	IHC 2	-(15/15)	+(8/15)	±(3/15)	-(15/15)	-(12/12)	
3. กุ้งก้ามกราม (<i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	อ.พระนครศรีอยุธยา	PCR	-(15)	+(15)	+(15)	-(15)	-(7)	
	จ.พระนครศรีอยุธยา	IHC 1	-(15/15)	+(2/15)	±(2/15)	-(15/15)	-(7/7)	
	5 ppt	IHC 2	-(15/15)	+(3/15)	±(2/15)	-(15/15)	-(8/8)	

IHC = Immunohistochemistry การตรวจเนื้อเยื่อต่างๆ จากตัวอย่างกุ้งทุกตัว

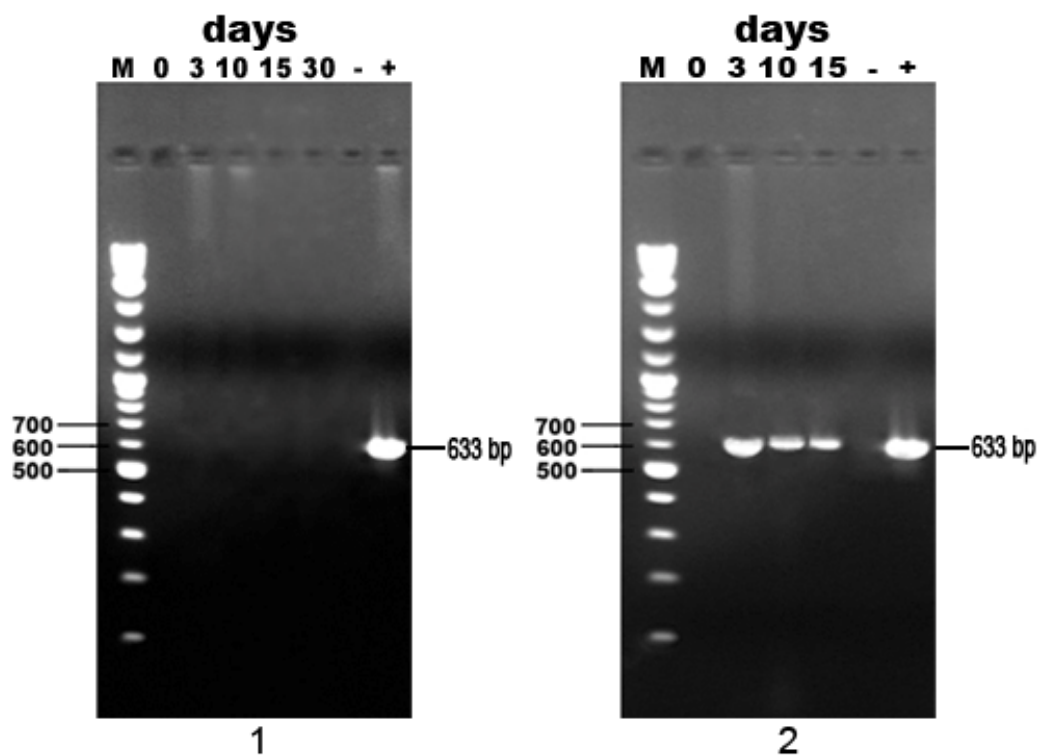
PCR = Polymerase Chain Reaction ทำการตรวจตัวอย่างกุ้งในแต่ละกลุ่มรวมกัน

ND = Not determined

- = ไม่ติดเชื้อ

± = ติดเชื่อน้อยมาก

+ = ติดเชื้อชัดเจนปริมาณต่างๆ



ภาพประกอบ 12 แสดงผลการทำ PCR ของกิ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) (1) การตรวจจากการทดลองการให้กินเนื้อกิ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และ (2) การตรวจจากการทดลองโดยการฉีด haemolymph ของกิ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

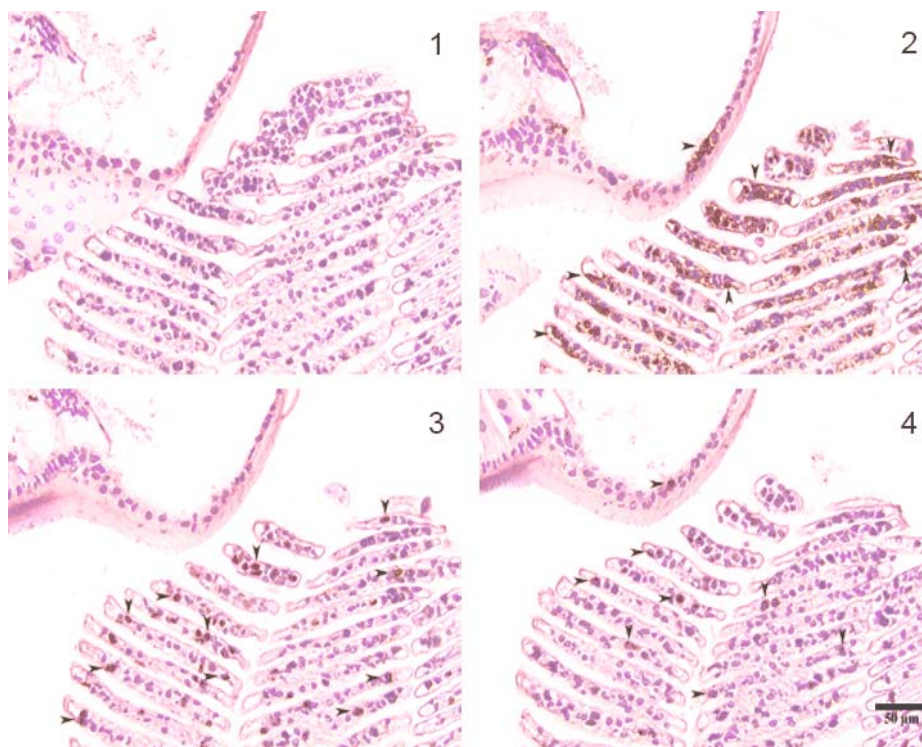
M = DNA marker

+ = positive control

- = negative control

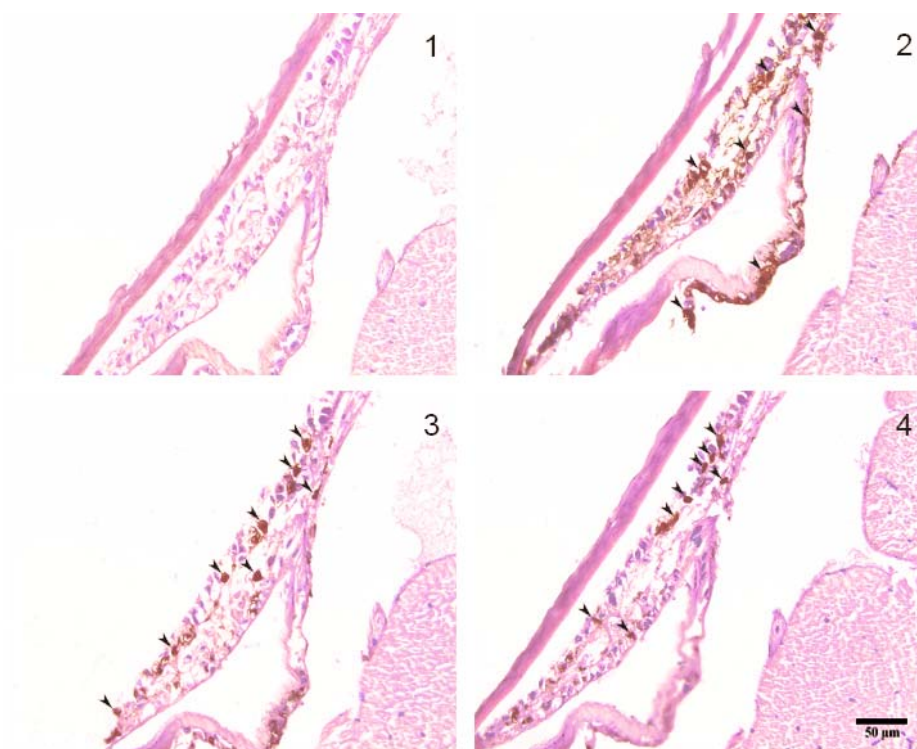
0 = เนื้อเยื่อต่างๆ จากกิ้งที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติ

3 10 15 และ 30 = ระยะเวลาต่างๆจากการชักนำให้ติดเชื้อโดยการกินและฉีดด้วย haemolymph ของกิ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว



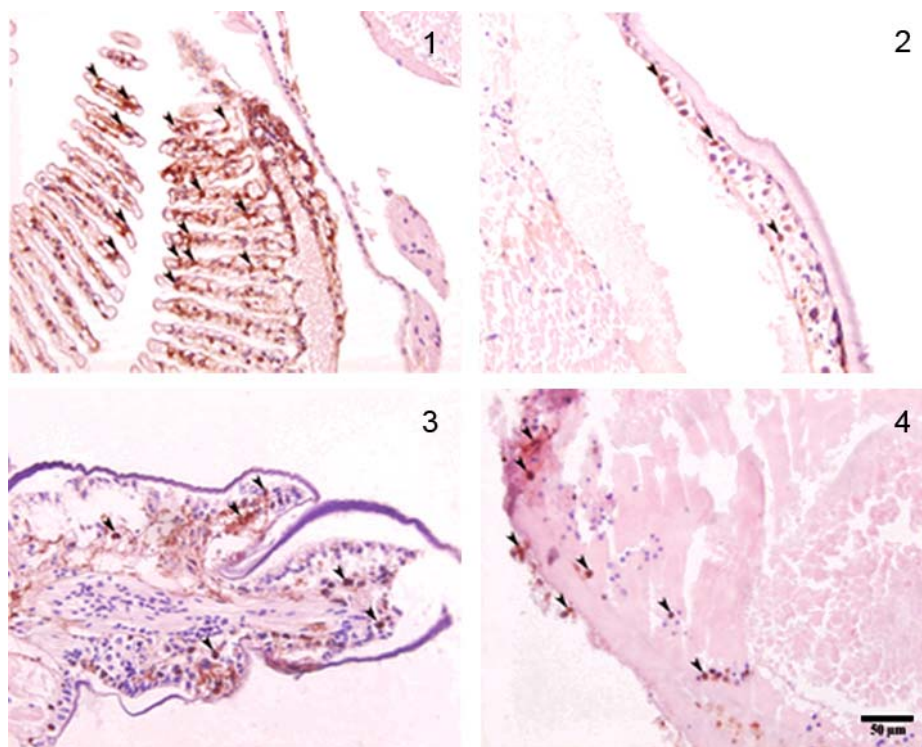
ภาพประกอบ 13 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 26 และ 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

- 1 = ตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดี
- 2 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 kDa (W10)
- 3 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 26 kDa (W17)
- 4 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29)

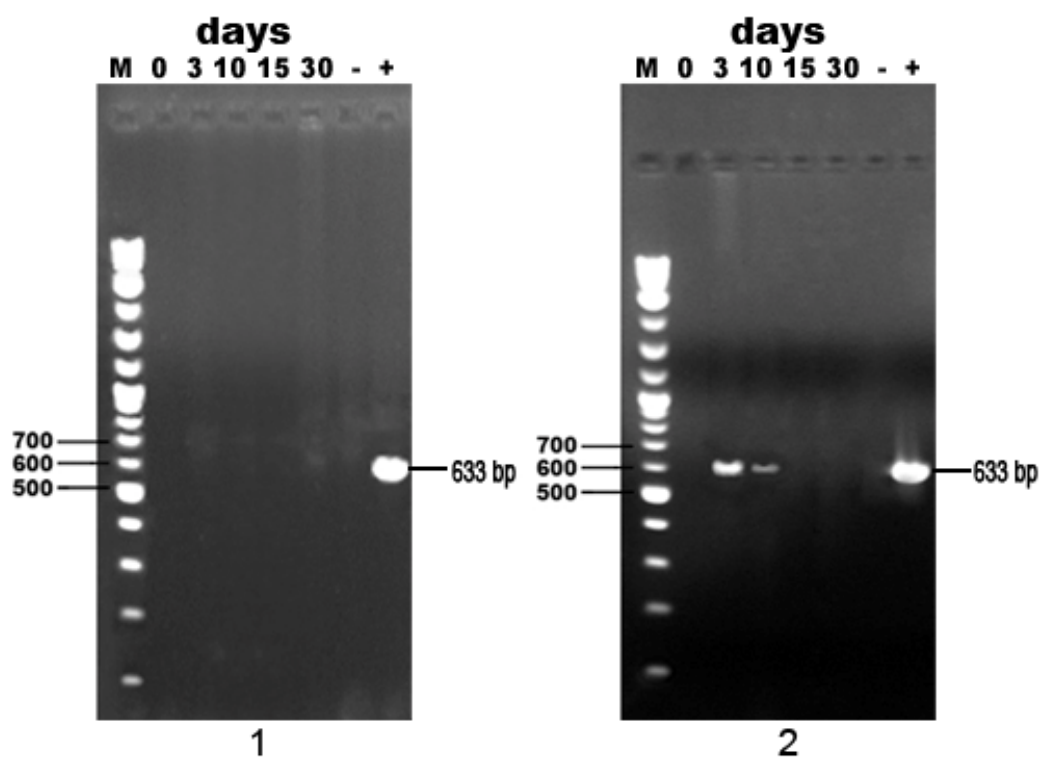


ภาพประกอบ 14 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณเยื่อบุผิวใต้เปลือกของกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 10 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 26 และ 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

- 1 = ตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดี
- 2 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 kDa (W 10)
- 3 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 26 kDa (W 17)
- 4 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W 29)



ภาพประกอบ 15 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ (ลูกศร) ของกึ่งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W 29) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (1 = เหงือก 2 = เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก 3 = ระยางค์ขา 4 = กล้ามเนื้อ)



ภาพประกอบ 16 แสดงผลการทำ PCR ของกิ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) (1) การตรวจจากการทดลองการให้กินเนื้อกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและ (2) การตรวจจากการทดลองโดยการฉีด haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

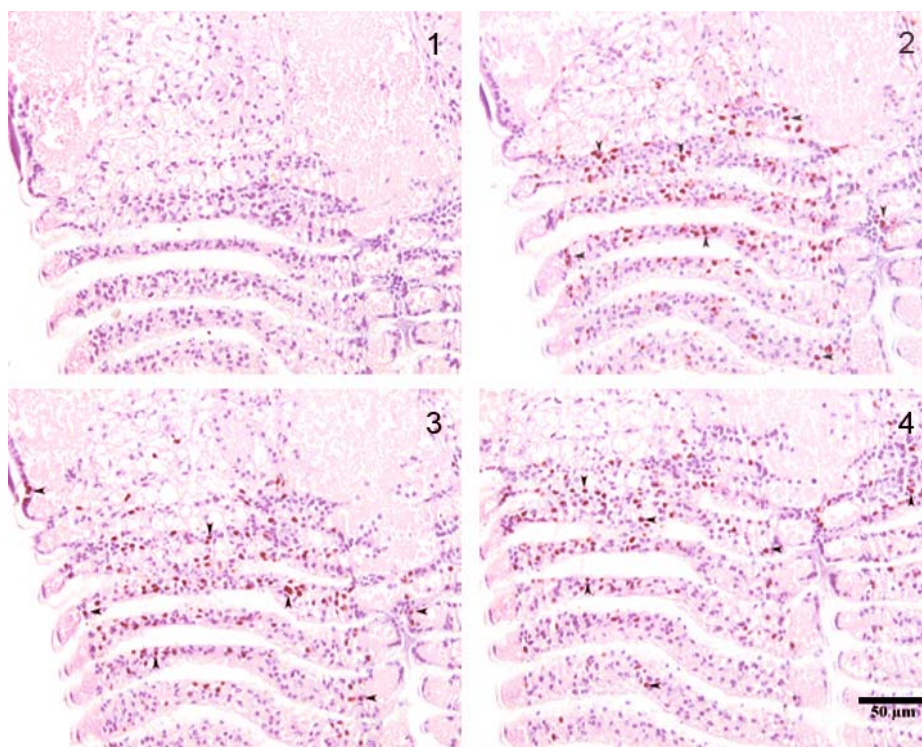
M = DNA marker

+ = positive control

- = negative control

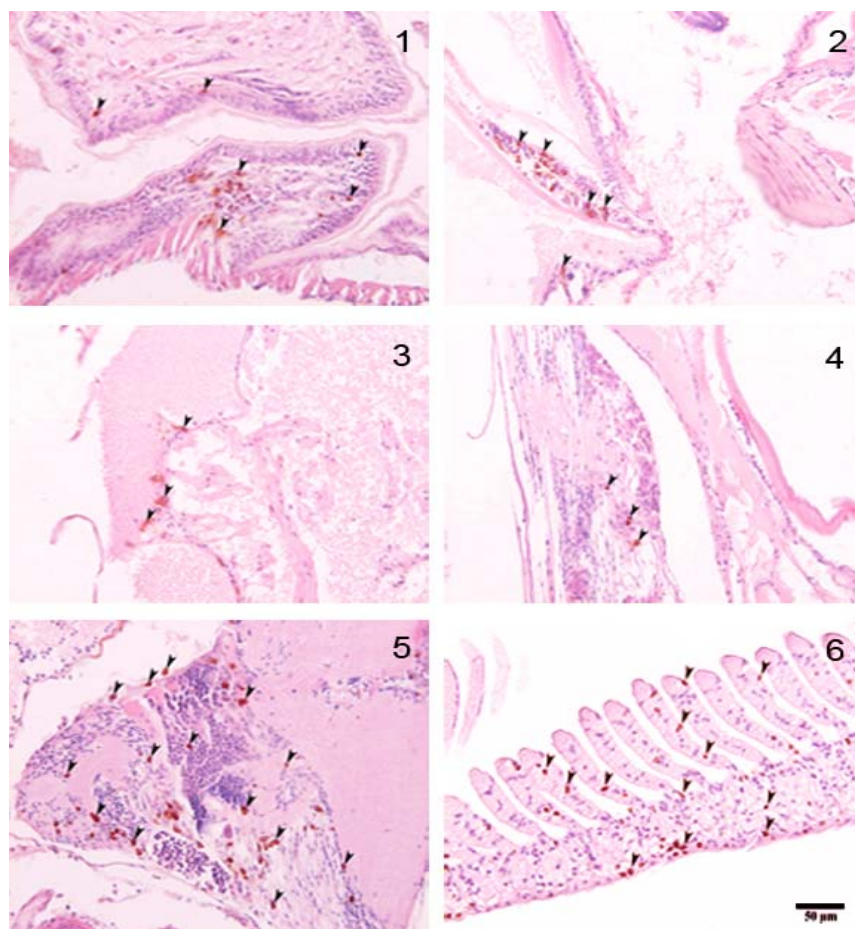
0 = เนื้อเยื่อต่างๆ จากกิ้งที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติ

3 10 15 และ 30 = ระยะเวลาต่างๆจากการชักนำให้ติดเชื้อโดยการกินและฉีดด้วย haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

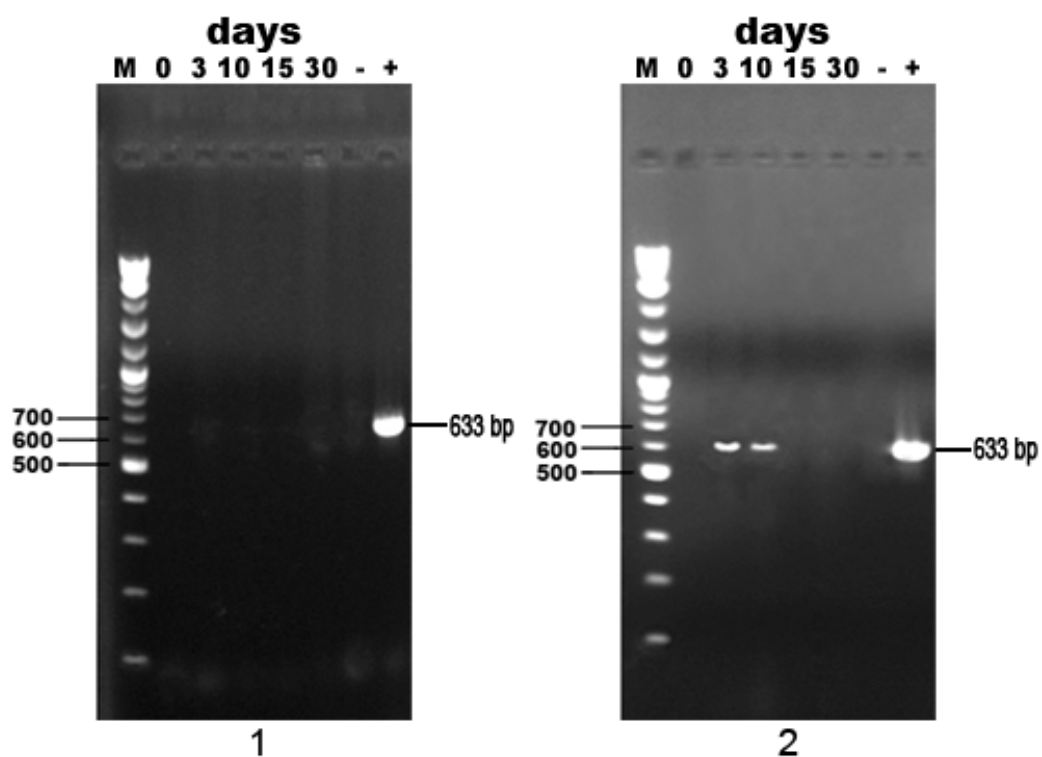


ภาพประกอบ 17 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของกุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immuno-histochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 26 และ 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

- 1 = ตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดี
- 2 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 kDa (W10)
- 3 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 26 kDa (W17)
- 4 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29)



ภาพประกอบ 18 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ (ลูกศร) ของกุ่มฝอยน้ำจืด (*M. lancheasteri*) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (1 = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน 2 = เนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก 3 = กล้ามเนื้อ 4 = เส้นประสาท 5 = ก้านตา และ 6 = หัวใจ)



ภาพประกอบ 19 แสดงผลการทำ PCR ของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) (1) การตรวจจากการทดลองการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและ (2) การตรวจจากการทดลองโดยการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

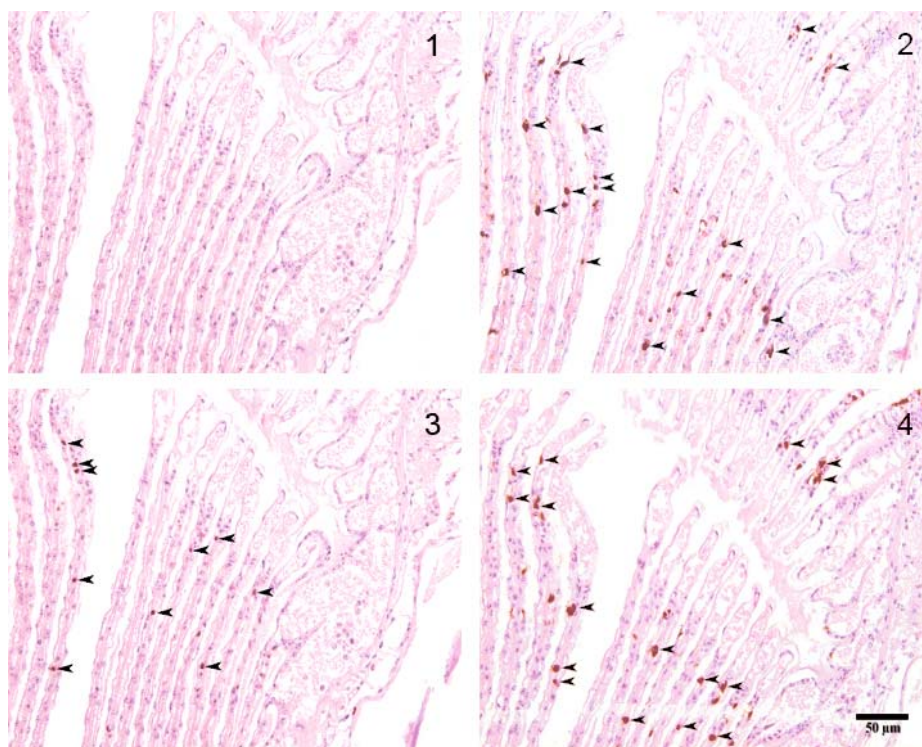
M = DNA marker

+ = positive control

- = negative control

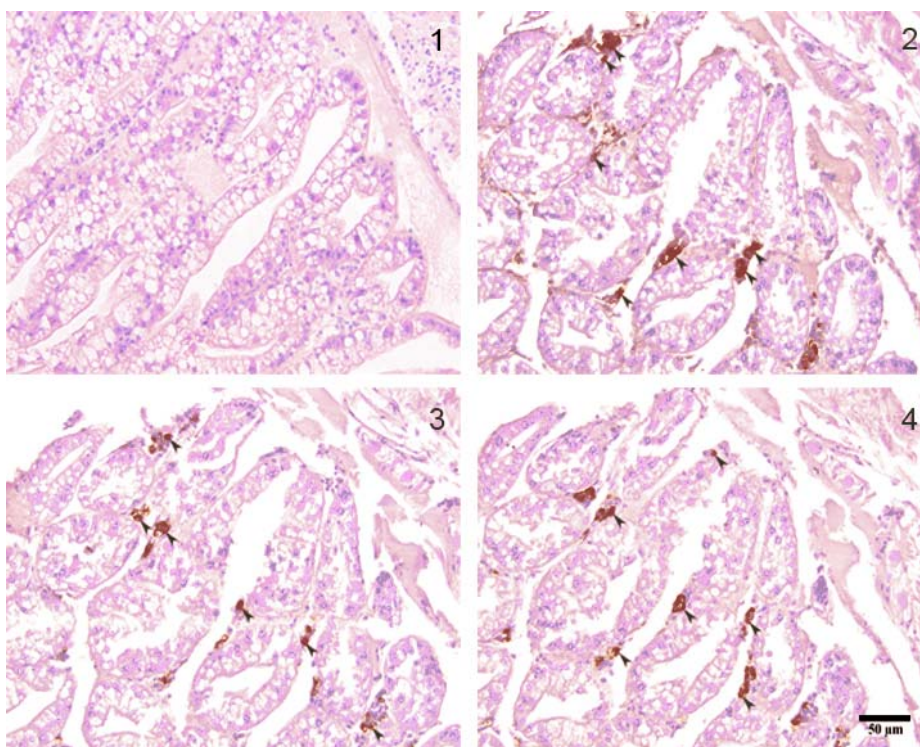
0 = เนื้อเยื่อต่างๆ จากกุ้งที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติ

3 10 15 และ 30 = ระยะเวลาต่างๆจากการชักนำให้ติดเชื้อโดยการกินและฉีดด้วย haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว



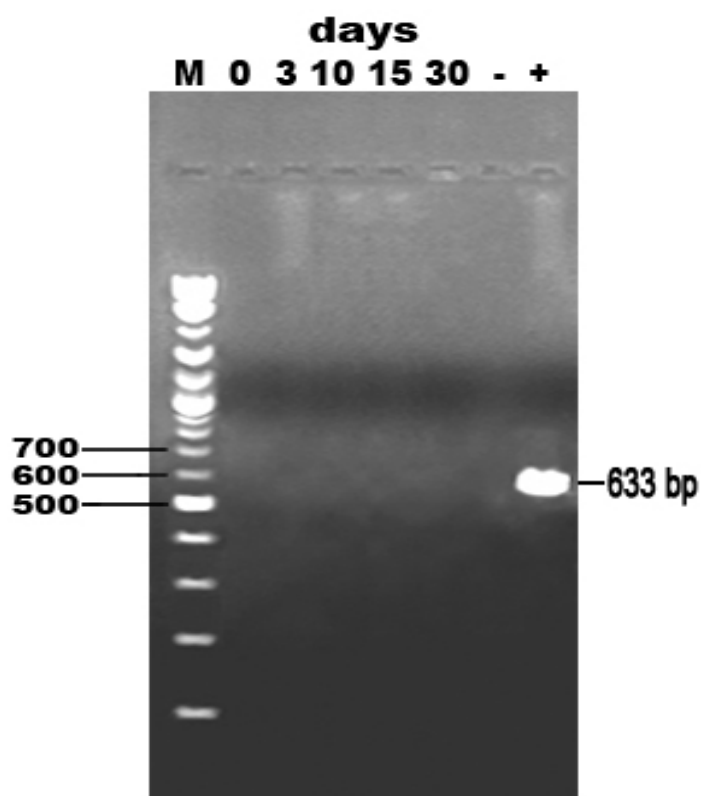
ภาพประกอบ 20 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immuno histochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 26 และ 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

- 1 = ตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดี
- 2 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 kDa (W10)
- 3 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 26 kDa (W17)
- 4 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29)



ภาพประกอบ 21 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวบริเวณตับและตับอ่อนของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ที่ฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 26 และ 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

- 1 = ตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดี
- 2 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 kDa (W10)
- 3 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 26 kDa (W17)
- 4 = โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29)



ภาพประกอบ 22 แสดงผลการทำ PCR ของกุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) ที่ได้จากการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

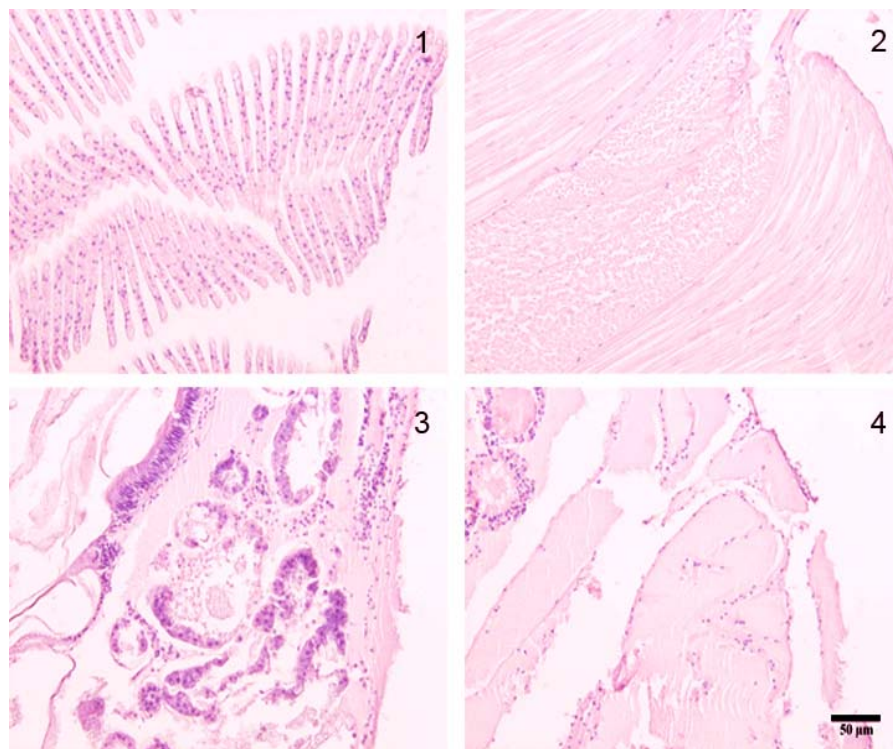
M = DNA marker

+ = positive control

- = negative control

0 = เนื้อเยื่อต่างๆ จากกุ้งที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติ

3 10 15 และ 30 = ระยะเวลาต่างๆจากการชักนำให้ติดเชื้อโดยการกินและฉีดด้วย haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว



ภาพประกอบ 23 แสดงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆ (ลูกศร) ของกุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) ที่กินกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นเวลา 3 วัน และตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 28 kDa (W29) ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (1 = เหงือก 2 = กล้ามเนื้อ 3 = ตับ และ 4 = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สามารถรวบรวมกุ้งในวงศ์ Palaemonidae 3 ชนิด คือ กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) กุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) และวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) จากแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำแหล่งน้ำธรรมชาติและชายฝั่งทะเล ป่าชายเลนในอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ และอำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งทั้ง 2 วงศ์ ที่รวบรวมได้จากธรรมชาติ จากการทดลองชักนำให้ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวและการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้าสู่กุ้งทดลองโดยตรง และนำไปเลี้ยงโดยจะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งทดลองในวันที่ 3 10 15 และ 30 ตามลำดับ นำไปตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี PCR และ immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 19 26 และ 28 kDa ของไวรัสตัวแดงดวงขาว คือ W10 W17 และ W29 (ชัยวิสุทธางกูร และคนอื่นๆ 2004: 359) ผลการตรวจสอบด้วยวิธี PCR ไม่พบการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งทั้ง 2 วงศ์ที่รวบรวมได้จากธรรมชาติและในกุ้งที่ชักนำให้ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธีการกิน ซึ่งเหมือนกับผลจากการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยไม่พบลักษณะตะกอนสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาแอนติ บอดีจับกับแอนติเจนตามเนื้อเยื่อต่างๆ ในกุ้งทั้ง 2 วงศ์ สำหรับการตรวจสอบการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ชักนำโดยวิธีการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กับกุ้งวงศ์ Palaemonidae ทั้ง 3 ชนิด สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ทั้ง 2 วิธี โดยเฉพาะในกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) พบการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรงตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากการติดเชื้อและเมื่อตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry พบการติดเชื้อในอวัยวะต่างๆ เช่น เหงือก เนื้อ-เยื่อผิวหนังได้ เปลือก อวัยวะน้ำเหลือง ตับ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รัยางค์ ขาวายน้ำ และกล้ามเนื้อ เป็นต้น ส่วนในกุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) และกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันที่ 3 หลังจากนั้นการติดเชื้อเช่นเดียวกัน แต่มีจำนวนตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อที่น้อยกว่าในกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) โดยปริมาณการติดเชื้อจะลดลงในวันที่ 10 และจะไม่สามารถตรวจพบได้ที่ 15 และ 30 วัน ตามลำดับ

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งชนิดต่างๆ จาก 2 วงศ์ โดยการให้กินเนื้อหรือการฉีด haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่าการชักนำให้กุ้งทดลองติดเชื้อโดยวิธีการฉีดให้ผลดีกว่าการให้ได้รับเชื้อโดยการกิน โดยเฉพาะกุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) เพราะกุ้งจะได้รับเชื้อโดยตรง (ตาราง 4) และสามารถตรวจพบการติดเชื้อในอวัยวะต่างๆ ซึ่งสอดคล้องกับ

การศึกษาของศุภมาศและคนอื่นๆ (1998: 79 - 85) ที่ศึกษาการถ่ายทอดของไวรัสตัวแดงดวงขาวจาก กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไปยังครัสเตเชียอื่น 3 ชนิด ได้แก่ ปูม้า (*P. pelagicus*) ปูทะเล (*S. serrata*) และกุ้งเคย (*Acetes* sp.) โดยการชักนำให้กุ้งทดลองติดเชื้อไวรัสโดยการฉีด การจุ่ม และการกิน พบว่า การฉีดจะให้ผลดีที่สุดโดยทำให้กุ้งตาย 100% ภายใน 3 วัน ส่วนการจุ่มและการกิน พบอัตราการตาย 100% ภายใน 5 วันและ 20% ภายใน 9 วัน ตามลำดับ ทั้งนี้ผลการทดลองที่ได้ยังคล้ายกับผลการทดลองที่ชักนำให้กุ้งในวงศ์ Palaemonidae และ Penaeidae ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีการฉีดจะมีสัดส่วนการติดเชื้อที่มากกว่าการทดลองโดยการกินเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ยัยนับ แวะและ 2544)

จากการทดลองยังพบว่ากุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) และกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) มีอัตราการติดเชื้อที่น้อยกว่ากุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) มาก แสดงว่าในกุ้งทั้ง 2 ชนิดนี้น่าจะมีความทนทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมากกว่า และอาจมีการกำจัดเชื้อไวรัสชนิดนี้ออกนอกร่างกายทำให้ไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อได้ในวันที่ 15 และ 30 ซึ่งคล้ายกับการศึกษาการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งน้ำจืด 3 ชนิด คือ กุ้ง *M. idella*, กุ้ง *M. lamerrae* และกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* โดยการฉีด การกิน และการจุ่ม พบว่า กุ้งก้ามกรามจะไม่พบอาการของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเลย (Hameed; Charies & Anikumar 2000: 207 - 213) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาคัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งก้ามกราม พบว่ากุ้งก้ามกรามสามารถทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ ในขณะที่กุ้งที่อยู่ในวงศ์เดียวกับกุ้งก้ามกรามคือวงศ์ Palaemonidae ชนิดอื่นๆ เช่น กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) กุ้งฝอยน้ำจืด (*M. lanchesteri*) กุ้งกะต๋อม (*M. sintangense*) กุ้งกะเปาะ (*P. styliferus*) กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) และกุ้งในวงศ์ Penaeidae เช่น กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองอย่างรุนแรง (Longyant; et al. 2005, 2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งฝอยน้ำจืดและกุ้งก้ามกราม น่าจะมีกลไกที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสทำให้มีความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

จากผลการตรวจดูเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่างๆ ที่มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จะเห็นลักษณะของการติดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียส แสดงให้เห็นว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวซึ่งเป็น DNA virus จะมีการเพิ่มจำนวนภายในนิวเคลียส โดยนิวเคลียสจะมีการบวมโตผิดปกติ โดยอวัยวะเป้าหมายในการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แก่ เหงือก เนื้อเยื่อน้ำเหลือง และเนื้อเยื่อใต้เปลือก (Chang; et al. 1996: 133) สำหรับการตรวจการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ในกุ้งทดลองด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสอื่นๆ เช่น ไวรัสหัวเหลือง (Sithigorngul; et al. 2000, 2002) ไวรัสเชฟฟี (Rukpratanporn; et al. 2005) และไวรัสเอ็มบีวี (Boonsanongchokying ; et al. 2006) ไม่พบการติดเชื้อไวรัสเหล่านี้ในอวัยวะต่างๆ ของกุ้งเหล่านี้

จะเห็นว่าจากการทดลองครั้งนี้ การตรวจการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี immuno-histochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถใช้ยืนยันผลจากการตรวจการติดเชื้อไวรัสโดยวิธี PCR ในกุ้งเหล่านี้ได้อย่างดี ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่ากุ้งบางชนิดเช่น กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*P. serrifer*) อาจเป็นพาหะของโรคตัวแดงดวงขาวได้ และบางชนิดเช่น กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) อาจทนทานและสามารถต้านทานการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ เนื่องจากมีกลไกบางอย่างในการช่วยกำจัดเชื้อไวรัสออกจากร่างกาย

ประโยชน์ของการวิจัย

อุตสาหกรรมกุ้งเป็นสินค้าส่งออกทำรายได้ให้กับประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท แต่ปัจจุบันปริมาณน้อยลงเนื่องจากประสบปัญหาทั้งจากด้านพันธุกรรมและโรคระบาด การวิจัยครั้งนี้จึงเป็นแนวทางในการลดการระบาดของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งผลการวิจัยที่ได้ทำให้ทราบว่ากุ้งก้ามกรามน่าจะมีความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสูงกว่ากุ้งกุลาดำ เพราะมีอัตราการติดเชื้อไวรัสต่ำมาก หากเรานำมาเลี้ยงร่วมกันในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำอาจช่วยลดปริมาณของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ และอาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะสามารถนำไปใช้ศึกษากลไกหรือความสัมพันธ์ระหว่างกุ้งก้ามกรามกับไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มระยะเวลาทำการทดลองการชักนำการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการกินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมากกว่า 30 วัน ในกุ้งสกุล *Macrobracium*
2. ทำการทดลองและติดตามการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในวงชีวิตของกุ้งสกุล *Macrobracium* หลายๆ สปีชีส์

ตาราง 4 สรุปศักยภาพในการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae โดยตรวจการติดไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W10, W17 และ W29 ในกุ้งชนิดต่างๆ

ชนิดของกุ้ง	โมโนโคลนอลแอนติบอดี			ตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry			
	W10	W17	W29	ธรรมชาติ	กิน	ฉีดครั้งที่1	ฉีดครั้งที่2
วงศ์ Palaemonidae							
<i>Palaemon serrifer</i>	++	++	++	0/15	0/45	21/45 (0.46)	31/45 (0.68)
<i>Macrobrachium lanchesteri</i>	±	±	±	0/15	0/57	7/30 (0.23)	8/57 (0.14)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	±	±	±	0/15	0/52	2/52 (0.04)	3/53 (0.06)
วงศ์ Atyidae							
<i>Caridina</i> sp	-	-	-	0/30	0/90	*	*

ชนิดของกุ้ง	ตรวจด้วยวิธี PCR		
	ธรรมชาติ	กิน	ฉีด
วงศ์ Palaemonidae			
<i>Palaemon serrifer</i>	0/15	0/45	45/45 (1.00)
<i>Macrobrachium lanchesteri</i>	0/15	0/57	30/57 (0.52)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	0/15	0/52	30/53 (0.56)

+ พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

- ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

* ไม่ได้ทำการทดลอง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- จรัสพร ตั้งขบวนบุตร. (2547). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนเปลือก VP 28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว. ปรินญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2543). กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ : เจริญรัฐการพิมพ์.
- พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. (2532). อนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนิโคในประเทศไทย. วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- สิริ ทุกขวินาศ; และชุติมา ขมวิสัย. (2545). แนวทางวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย. วารสารกรมประมง (ออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.nicaonline.com/article2/site/viewarticle.asp?idarticle=122>. วันที่สืบค้น 19 พฤษภาคม 2548.
- สุดา ชูถิ่น. (2546). การตรวจสอบการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium*. ปรินญานิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ยัยนั๊บ แวและะ. (2545). การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ *Palaemonidae* *Penaeidae* และ *Atyidae* โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี. ปรินญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- Anil, T.M.; Shankar, K.M.; & Mohan, C.V. (2002). Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. *Diseases of Aquatic Organisms*. 51: 67 - 75.
- Boonsanongchokying, C.; et al. (2006). Production of Monoclonal Antibodies to Polyhedrin of Monodon Baculovirus (MBV) from Shrimp *ScienceAsia* 32: 371 – 376.
- Chaivisuthangkura, P.; et al.(2004). Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP 28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *ScienceAsia*. 30: 359 - 363.
- Chaivisuthangkura, P.; et al.(2006). Polyclonal antibodies specific for VP 1 and VP 3 capsid protein of Taura syndrome virus (TSV) produced via gene cloning and expression. *Diseases of Aquatic Organisms*. 69: 249 – 253.

- Chang, P.S.; et al. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27: 131 – 139.
- Chen, LL.;et al. (2000). Natural and experimental infection of white spot syndrome in Banthic larvae of mud crab *Scylla serrata*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 40: 157 - 161.
- Chou, H.Y.; et al. (1995). Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in Cultured panaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25 : 133 – 141.
- Flegel, T.W. (1997). Special topic review : major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal Microbial Biotechnology*. 13: 433 - 442.
- Flegel, T.W.; Fegan, D.F.;& Sriurairatana, S. (1995). Environmental control of infectious shrimp Disease in Thailand. *In Asian aquaculture II Asean fisheries Society*. Manila: Philippines. pp. 65-79.
- Hameed, A. S. S.; Charles, M. X. & Anilkumar, M. (2000). Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* of white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organism*. 183: 207 - 213.
- Kanchanaphum, P.; et al. (1998). Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organism*. 34: 1- 7.
- Kasornchandra, J.; & Boonyaratpalin, S. (1994). White spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *Farming*. 12: 9 - 11.
- Lightner, D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for disease of penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge.
- Lightner, D.V. & Redman, R.M. (1998). Shrimp disease and current diagnostic method. *Aquaculture*. 164: 201 - 220.
- Liu, W ; et al. (2002). Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). *Diseases of Aquatic Organisms*. 49: 11 - 18.

- Lo, C.F.; et al. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25: 133 – 141.
- Lo, C.F.; et al. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27: 215 - 225.
- Lo, C.F.; et al. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 30: 53 - 72.
- Lo, C.F.; et al. (1998). Virus – associated White Spot Syndrome of Shrimp in Taiwan: A Review. *Fish Pathology*. 365 – 371.
- Longyant, S.; et al. (2005). Differences in susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Diseases of Aquatic Organisms*. 64: 5 – 12.
- Longyant, S.; et al. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*. 257: 83 - 91.
- Lu, Y.; et al. (1995). Distribution of yellow-head virus in selected tissue and organ of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23 : 67 - 70.
- Mohan, C.V.; et al. (1998). Histology of cultured shrimp showing gross sign of yellow – head syndrome during 1994 Indian Epizootics. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34: 9 - 12.
- Nadala, E.C.B.Jr; Tapay, L.M.; & Loh, P.C. (1997). Yellow – virus : a rhabdovirus – like Pathogen of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 141 – 146.
- Nadala, E.C.B.Jr; Tapay, L.M.; & Loh, P.C. (1998). Characterization of a non – occluded baculovirus – like agent pathogenic to penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 33 : 221 – 229.
- Rukpratanporn, S.; et al. (2005). Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *P. monodon* *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 85 – 89.
- Sithigorngul, P.; et al. (2000). Development of a monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) from *P. monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42: 27 – 34.

- Sithigorngul, P.; et al. (2002). Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) of *P. monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49: 71 – 76.
- Supamattaya, K.; et al. (1998). Experiment transmission of white spot syndrome (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelegicus*, mud crab *Scylla serrata* and Krill *Acetes* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32: 79 – 85.
- Tapay, L.M.; et al. (1997). Infection of white spot baculovirus – like (WSBV) of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *Diseases in Aquaculture III, Asian Fisheries Society*, pp. 285 - 295.
- Peng, S.E.; et al. (1998). Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. *Aquaculture*. 164: 253 – 262.
- Van Hulten, M.C.W.; et al. (2000a). Analysis of genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonuclease genes repeat regions. *Journal of General Virology*. pp. 307- 316.
- Van Hulten, M.C.W.; et al. (2000b). Identification of two major virion protein genes of White spot syndrome virus of shrimp. *Virology*. 266: 227 – 236.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ชนิดของสัตว์ในวงศ์ Palaemonidae , Atyidae

ชนิดของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Decapoda
	Family	Palaemonidae
	Genus	<i>Palaemon</i>
	Species	<i>serrifer</i> (Holthuis.1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกุ้งฝอยน้ำเค็ม มีดังนี้ (พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล.

2518)

ลักษณะเด่น

เป็นกุ้งขนาดเล็ก อาศัยอยู่ในแอ่งน้ำของบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีน้ำขึ้นลงถึง ลำตัวใสไม่มีสี ขาเดินคู่ที่ 2 ยาวเท่ากัน ผิวโดยรอบมีลายปะสีน้ำตาล ตรงรอยต่อระหว่างข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 กับตรงกลางของข้อต่อที่ 5 ของขาเดินคู่ที่ 3 คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 มีสีส้มแกมเหลืองคาดอยู่รอบข้อ กริตรงปลายงอนขึ้นเล็กน้อย และยาวกว่าแผ่นกำบังหนวดของหนวดคู่ที่ 2 แฉกแบบฟันเลื่อยของกริด้านบน มี 11 อัน ด้านล่างมี 4 อัน

ลักษณะทั่วไป

กรี มีลักษณะตรง ปลายงอนขึ้นเล็กน้อย และยาวกว่าแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ด้านบนมีแฉกแบบฟันเลื่อย 11 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 3 อัน อยู่ถัดไปทางปลายของกรี 8 อัน แฉกแต่ละอันอยู่ห่างกันเป็นระยะเท่ากัน นอกจากแฉกอันแรกและอันสุดท้ายจะอยู่ห่างจากแฉกอันอื่น ๆ มาก ด้านล่างมีแฉกแบบฟันเลื่อย 4 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากันจากบริเวณที่อยู่ถัดจากเบ้าตาออกไปจนถึงปลายของกรี แผ่นกำบังหนวดของหนวดคู่ที่ 2 ขอบด้านบนตรง ตรงโคนของขอบด้านในโค้งออกและเรียวสอบเข้าไปทางปลาย carapace ผิวเกลี้ยงเรียบ สันของหนามตรงบริเวณหนวดและสันของหนามตรงบริเวณเหงือก ขนานกันในแนวราบ

ชนิดของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae

ชนิดของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae เช่น กุ้งกะเปาะ *P. styliiferus* กุ้งฝอยน้ำเค็ม *P. serrifer* กุ้งกะต๋อม *M. sintangense* กุ้งฝอยน้ำจืด *M. lanchesteri* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*

ชนิดของกุ้งในวงศ์ Atyidae เช่น กุ้งกะปิ *Caridina* sp.

เปรียบเทียบลักษณะของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae และ Atyidae

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae

ขอบด้านหน้าและด้านท้ายของ Pleuron แผ่นที่ 2 ทับ Pleuron แผ่นที่ 1 และแผ่นที่ 3 ขาเดินคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 เป็นก้ามหนีบ และที่ปลายก้ามหนีบไม่มีพู่ขน ขาเดินคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่และยาวกว่าขาเดินคู่ที่ 1 ข้อ 5 ของขาเดินคู่ที่ 2 มีลักษณะเป็นข้อเดียว ขาเดิน 3 คู่สุดท้ายไม่เป็นก้ามหนีบ อาศัยอยู่ในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล (พืมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. 2518)

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Atyidae

กรีเจริญดี สองปล้องสุดท้ายของฐานหนวดคู่ที่ 1 อย่างน้อยที่สุดมีความกว้างเท่ากับความยาว mandible ไม่มี mandible palp ไม่มีร่องแยกกระหว่าง incisor และ molar ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ไม่เท่ากัน และมีลักษณะเป็นก้ามหนีบ Carpus ไม่เป็นปล้อง ปลายของนิ้วทั้งสองมีลักษณะเป็นพู่ขน ปลายหางจะชูและมนอาศัยอยู่ในน้ำจืดทั้งหมด พบได้ทั่วโลก ยกเว้นส่วนของขั้วโลก โดยพบมากในเขตร้อนและอบอุ่น (กัลยานี ยงจินดารัตน์. 2531)

กุ้งในวงศ์ Palaemonidae

กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*

กุ้งก้ามกราม หรือ กุ้งนาง หรือ กุ้งหลวง เป็นกุ้งชนิดเดียวกัน กุ้งก้ามกรามมีกระจายอยู่ทั่วไปในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งประกอบด้วย พม่า เวียดนาม เขมร อินโดนีเซีย และ ฟิลิปปินส์ ปกติกุ้งก้ามกรามสามารถพบได้ทั้งปี และ ส่วนมากจะอยู่ในแม่น้ำลำคลอง หนอง บึง ทะเลสาบที่มีเขตติดต่อกับแม่น้ำ กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งที่นิยมรับประทานกันมากในภูมิภาคเอเชีย ทั้งไทย พม่า ลาว มาเลเซีย รวมทั้งจีน ฮองกง และ ไต้หวัน เป็นต้น ปัจจุบันมีบางประเทศในยุโรปหันมารับประทานกุ้งก้ามกรามกันบ้างแล้ว

ชีววิทยาของกุ้งก้ามกราม

ชื่อเรียกทั่วไปในท้องถิ่นต่างๆ กุ้งก้ามกราม กุ้งนาง กุ้งหลวง กุ้งก้ามเกลี้ยง กุ้งแห และ กุ้งใหญ่

ชื่อสามัญ Giant Freshwater Prawn

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Macrobrachium rosenbergii* de man

อนุกรมวิธาน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Suborder	Natantia
Family	Palaemonidae
Genus	<i>Macrobrachium</i>
Species	<i>rosenbergii</i> (Holthuis, 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกุ้งก้ามกราม มีดังนี้ (พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล, 2518)

ลักษณะเด่น

กรีกส่วนโคนที่อยู่เหนือตาโค้งงูขึ้น และส่วนปลายเรียวงอนขึ้น แง่ยื่นแบบฟันเลื่อยของกรีกด้านบนและกรีกด้านล่างมีจำนวนใกล้เคียงกันคือประมาณ 12 - 13 อัน ขาเดินคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่และยาวไม่เท่ากัน ผิวด้านนอกของขาเดินมีหนามแหลมเรียงอยู่กระจัดกระจายนอกจากนี้ของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวได้ จะมีขนปุกปุยคลุมอย่างหนาแน่น

ลักษณะทั่วไป

กรีกส่วนโคนที่อยู่เหนือตาโค้งงูขึ้นเล็กน้อย ส่วนปลายมีลักษณะเรียวงอนขึ้น และยาวเลยปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ด้านบนของกรีกมีแง่ยื่นแบบฟันเลื่อย 13 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 2 อัน อยู่บนส่วนโค้งงูเหนือตา 4 อัน และเรียงอยู่ถัดไปทางปลายของกรีก 7 อัน แง่ยื่น 2 อัน ที่อยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace กับแง่ยื่น 3 อัน ที่อยู่ปลายสุดของกรีกจะเรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน และมีระยะห่างมากกว่าระยะห่างระหว่างแง่ยื่นของกรีกที่อยู่บนส่วนโค้งงูเหนือตา แต่มีระยะห่างน้อยกว่าระยะห่างระหว่างแง่ยื่นของกรีก 3 อัน ที่อยู่ถัดจากส่วนโค้งงูเหนือตาออกไปทางปลายของกรีกด้านล่างของกรีกมีแง่ยื่นแบบฟันเลื่อย 13 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากันตลอดความยาวของกรีก ด้านข้างของกรีกเป็นสันยาวจากเบ้าตาไปจนถึงแง่ยื่นอันที่ 9 หรืออันที่ 10 ของกรีกทางด้านบน

Carapace ผิวเกลี้ยงเรียบ นอกจากบริเวณหัวใจ บริเวณกระเพาะอาหารและบริเวณที่อยู่เหนือหนามตรงบริเวณดัม มีเม็ดเล็ก ๆ อยู่กระจัดกระจาย สันของหนามตรงบริเวณหนดและดัมขนานกันทำมุมกับแนวราบเล็กน้อย

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขอบด้านนอกตรง ขอบด้านในตรงและขนานกันกับขอบด้านนอกปลายของแผ่นเรียวยแหลม

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวไม่เท่ากัน ขาข้างที่ยาวจะมีส่วนปลายของข้อที่ 4 อยู่ตรงกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ข้อที่ 3 ข้อที่ 4 และข้อที่ 5 เป็นรูปทรงกระบอกตอนปลายของข้อหนากว่าตอนโคน คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 3 ต่อ 2 ส่วนบนของข้อที่ 6 เป็นทรงกระบอกแบนจากบนลงมาล่างและกว้างเท่ากันตลอดผิวโดยรอบของข้อที่ 3 4 5 และส่วนโคนของข้อที่ 6 มีหนามแหลมเรียงกระจายเป็นแถว ซึ่งหนามแหลมที่อยู่บนผิวด้านนอกมีขนาดเล็กและสั้นกว่าหนามแหลมที่อยู่บนผิวด้านใน นิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก มีขนาดเล็กและเรียวกว่าส่วนโคนของข้อที่ 6 ตอนปลายแหลมและงุ้มเข้า ผิวด้านนอกของนิ้วมีหนามแหลมและเล็กกระจัดกระจาย นอกจากตอนปลายที่แหลมและงุ้มเข้า จะเกลี้ยงเรียบ ด้านในของนิ้วมีปุ่ม 2 ปุ่มติดกัน และงอขึ้นรูปกรวย 1 อัน อยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $\frac{1}{7}$ และ $\frac{1}{4}$ ของความยาวนิ้ว ตามลำดับ ถัดจากงอขึ้นรูปกรวยออกไปเป็นสันคมและยาวไปจนถึงปลายที่แหลมงุ้ม นิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวได้เป็นทรงกระบอกและมีขนาดเท่ากับนิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้ ผิวด้านนอกของนิ้วที่มีขนปกคลุมและยาวคลุมอย่างหนาแน่นอยู่ตลอดความยาวของนิ้ว นอกจากตอนปลายที่แหลมงุ้มเข้าและเรียบ ด้านในของนิ้วมีงอขึ้นรูปกรวยที่มีขนาดเท่ากัน 2 อัน อยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $\frac{1}{5}$ และ $\frac{1}{4}$ ของความยาวนิ้วตามลำดับ ถัดจากงอขึ้นอันที่ 2 ออกไปเป็นสันคมและยาวไปจนถึงปลายของนิ้วที่แหลมงุ้ม เมื่อหุบก้ามหนีบเข้ามาปลายของนิ้วนี้จะเกยกับปลายของนิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้ ข้อต่อต่างๆของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวจากน้อยไปหามากตามลำดับดังนี้ ข้อที่ 3 4 และ 5 ส่วนโคนของข้อที่ 6 และนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบซึ่งมีความยาวเท่ากัน

หางเป็นรูปสามเหลี่ยม ตอนปลายเป็นแฉะแหลมเล็ก สองข้างของแฉะแหลม มีหนามแหลม 2 คู่ คู่ในมีขนาดใหญ่และยาวกว่าคู่นอก

แพนหาง ปลายของแพนหางคู่นอก มีลักษณะตัดเป็นเส้นตรงและปลายของแพนหางคู่ในเรียวยแหลมเล็กน้อย

ไข่ เป็นรูปกลมรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 500 ไมโครเมตร

สี ลำตัวเป็นสีน้ำเงินแกมเขียว ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นสีน้ำเงินเข้ม

ขนาดของลำตัว มีความยาวโดยเฉลี่ยประมาณ 190 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัย

พบในแม่น้ำ ลำคลอง ลำห้วย ลำธาร ทะเลสาบ หรือแหล่งน้ำที่มีทางติดต่อกับทะเล

กุ้งฝอยน้ำจืด *Macrobrachium lanchesteri*

เป็นกุ้งน้ำจืดขนาดเล็ก มีเปลือกแข็งห่อหุ้มตัว มีขา 10 คู่ แบ่งแยกหน้าที่กันออกไปเป็นขาสำหรับจับอาหาร ขาเดิน และขาว่ายน้ำ ขาเดินคู่ที่สองมีขนาดใหญ่เท่ากับขาเดินคู่ที่ 4 และ 5 ขอบปลายลักษณะเป็นก้ามหนีบ อยู่รวมกันเป็นฝูง ลักษณะสำคัญประจำตัวคือ มีกิริยตรงขาเดิน 3 คู่ ยาวเท่ากัน แตกต่างจากลูกกุ้งก้ามกรามที่มีขนาดเท่ากัน ซึ่งจะมีกิริยาวปลายโค้งสูงขึ้น

ชีววิทยาของกุ้งฝอยน้ำจืด

ชื่อเรียกทั่วไปในท้องถิ่นต่างๆ กุ้งฝอย กุ้งนาง

ชื่อสามัญ LANCHESTER'S FRESHWATER PRAWN

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Macrobrachium lanchesteri*

อนุกรมวิธาน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Palaemonidae
Genus	<i>Macrobrachium</i>
Species	<i>Lanchesteri</i> (Holthuis.1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกุ้งฝอยน้ำจืด มีดังนี้ (พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. 2518)

ลักษณะเด่น

ก๊รี มีลักษณะตรงและยาวพอดีกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวเรียว และมีส่วนของก้ามหนีบ ยาวเลยปลายของก๊รี ขาสองข้างมีความยาวเท่ากัน ลำตัวใสไม่มีสี

ลักษณะทั่วไป

กรี มีลักษณะตรงและยาวพอดีกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขอบบนมีแฉ่งยื่นแบบฟันเลื่อย 7 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 1 อัน เหนือเป้าตา 4 อัน และที่ปลายของกรี 2 อัน แฉ่งที่ยื่นแต่ละอันเรียงอยู่ห่างเป็นระยะทางเท่ากัน นอกจากแฉ่งยื่น 2 อันสุดท้ายที่อยู่ปลายกรี จะอยู่ห่างจากแฉ่งยื่นอันที่ 5 มาก ขอบล่างมีแฉ่งยื่นอันที่ 6 ของกรีด้านบน

Carapace บริเวณผิวเกลี้ยงและเรียบ สันของหนามตรงบริเวณหนวดขนานกับสันของหนามตรงบริเวณตับและทำมุมกับแนวราบเล็กน้อย

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ค่อนข้างเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าและปลายมีลักษณะกลมมนขอบด้านในขนานกับขอบด้านนอก

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวเรียว และขาสองข้างยาวเท่ากัน มีส่วนของก้ามหนีบยาวเลยปลายของกรี ผิวโดยรอบเกลี้ยงเรียบ นอกจากนี้ทั้งทั้งสองของก้ามหนีบจะมีกลุ่มขนที่แข็ง กระจายอยู่เป็นกลุ่ม 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวและเรียวบางกว่าข้ออื่นๆตอนกลางส่วนโคนของข้อที่ 6 โป่งออกเล็กน้อย ด้านในของนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบมีแฉ่งยื่นรูปกรวยอยู่นิ้วละ 2 อัน เรียงอยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $\frac{1}{4}$ และ $\frac{1}{3}$ ของความยาวของนิ้วตามลำดับข้อต่างๆของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวเรียงจากน้อยไปหามากตามลำดับดังนี้ นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบ ข้อที่ 3 ส่วนของโคนข้อที่ 6 ข้อที่ 4 และข้อที่ 5

หาง เป็นรูปสามเหลี่ยมยาวเรียวและยาวไม่ถึงปลายของแพนหาง ปลายสุดเป็นแฉ่งแหลมเล็ก และมีหางนามแหลม 2 คู่ อยู่สองข้างของแฉ่งแหลม หนามคู่ในมีขนาดใหญ่และยาวกว่าหนามคู่นอก ผิวด้านบนของหางโค้งมนและมีหนามแหลม 2 คู่ อยู่ห่างจากโคนของหางประมาณ $\frac{1}{2}$ และ $\frac{3}{4}$ ของความยาวของหาง

แพนหาง ยาวเลยหางออกไปเล็กน้อย ปลายของแพนหางคู่ในกลมรี และปลายของแพนหางคู่นอกกลมมน

ไข่ เป็นรูปกลมรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 700 ไมโครเมตร

สี ลำตัวใส ไม่มีสี

ขนาด

ความยาวประมาณ 2 - 7 เซนติเมตร

ถิ่นอาศัย

อาศัยอยู่ในแม่น้ำ คู คลอง เกาะอยู่ตามก้นหินใหญ่ในแอ่งน้ำตกลอยอยู่บริเวณผิวน้ำตามชายริมตลิ่งซึ่งเป็นแหล่งน้ำนิ่งที่มีรากหญ้าและรากพันธุ์ไม้ น้ำ จะรวมกลุ่มอยู่กันชุกชุมในหนอง บ่อ บึง หรือตามบริเวณแหล่งน้ำซึ่งมีกระแสน้ำขึ้นลงไหลเอื่อยๆ

อาหาร

กินจุลินทรีย์และตัวอ่อนของสัตว์น้ำขนาดเล็ก

กุ้งในวงศ์ Atyidae

กุ้งกะปิ *Caridina* sp.

ชีววิทยาของกุ้งกะปิ

ชื่อเรียกทั่วไปในท้องถิ่นต่างๆ

ชื่อสามัญ LANCHESTER'S FRESHWATER PRAWN

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Caridina* sp.

อนุกรมวิธาน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Atyidae
Genus	<i>Caridina</i>
Species	(Holthuis, 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกุ้งกะปิ มีดังนี้ (กัลยานี ยงจินดารัตน์, 2531)

ลักษณะของกุ้งใน Family Atyidae

กริแฉก 2 คู่ สอดปลายสุดท้ายของฐานคู่ที่ 1 อย่างน้อยที่สุดความกว้างเท่ากับความยาว mandible ไม่มี mandibular palp ไม่มีร่องแยกระหว่าง incisor และ molar ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ไม่

เท่ากัน และมีลักษณะเป็นหนีบ carpus ไม่เป็นปล้อง ปลายของนิ้วทั้งสองมีลักษณะพู่ขน ปลายหางจะพู่และมน

ถิ่นอาศัย

อาศัยอยู่ในน้ำจืดทั้งหมด พบได้ทั่วโลก ยกเว้นส่วนของขั้วโลก โดยมากพบในเขตร้อนและเขตอบอุ่น

ลักษณะทั่วไปของ Genus Caridina

กริเรียบหรือมีฟัน ไม่มีหนามเหนือบ้าตา มีหนามบริเวณด้านข้างของ carapace ลักษณะส่วนหน้าซึ่งใกล้เคียงกับฐานหนวดคู่ที่ 2 Pterygostomian angle มน ส่วนปลาย carpus ของขาเดินคู่ที่ 1 จะว่ามีลักษณะคล้ายถ้วย ขาเดินคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 มีลักษณะเป็นกล้ามหนีบ บริเวณส่วนปลายของนิ้วทั้งสองมีขนเป็นพู่ ซึ่งความยาวของพู่จะสั้นกว่าความยาวของนิ้ว ขาเดินคู่ที่ 1 จะสั้นกว่าขาเดินคู่ที่ 2 ขาเดินไม่มี exopod แต่มี arthrobranch

ชนิดของกุ้งในวงศ์ Atyidae เช่น กุ้งกะปิ

จัดอยู่ใน	Phylum Arthropoda
Class	Crustacea
Order	Decapoda
Family	Atyidae
Genus	Caridina
Scientific name	<i>Caridina</i> sp.
Common name	-
Thai common name	กุ้งกะปิ

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Atyidae

กริเจริญดี สองปล้องสุดท้ายของฐานคู่ที่ 1 อย่างน้อยที่สุดความกว้างเท่ากับความยาว mandible ไม่มี mandibular palp ไม่มีร่องแยกระหว่าง incisor และ molar ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ไม่เท่ากัน และมีลักษณะเป็นหนีบ carpus ไม่เป็นปล้อง ปลายของนิ้วทั้งสองมีลักษณะพู่ขน ปลายหางจะพู่และมน อาศัยอยู่ในน้ำจืดทั้งหมดพบได้ทั่วโลก ยกเว้นส่วนของขั้วโลก โดยมากพบในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (กัลยานี ยงจินดารัตน์. 2531 : 13)

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

2. Merthiolate เข้มข้น 1%

ไธเมอร์โซล (Thimerosal) (Sigma)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ immunohistochemistry (IHC)

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (Coated slide solution)

เจลาติน	1.0	กรัม
โครเมียมโพแทสเซียมซัลเฟต ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2. น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

95% เอทานอล	30.0	มิลลิลิตร
ฟอร์มอลินเข้มข้น 100%	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร

3. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลาย calf serum 10% (P_1^+)

calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

5. สี Enrilich's acid hematoxylin

สี hematoxylin	8.0	กรัม
เอทานอล 95%	400.0	มิลลิลิตร
อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต	8.0	กรัม
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร
กลีเซอริน (glycerine)	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร

6. สี Eosin Y 0.2% ในเอทานอล 95%

สี Eosin Y	0.2	กรัม
95% เอทานอล	100.0	มิลลิลิตร

การตรวจการติดเชื่อในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry และวิธี indirect immunoperoxidase (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76)

1. วิธี immunohistochemistry (IHC)

1.1 ตัดส่วนหัว (Cephalothoraxes) ของกุ้งขาวที่เกิดการติดไวรัสโรคทอราแล้วนำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 นำมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (Dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน และบิวทานอลตามลำดับดังนี้

1.3.1 แช่ในเอทานอล 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.2 แช่ในเอทานอล 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

1.3.3 แช่ในเอทานอล 95% 2 ครั้ง ละครึ่ง 24 ชั่วโมง

1.3.4 แช่ในบิวทานอล 1 ครั้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.5 แช่ในที่บิวทานอลผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3.6 แช่ในไซลีน 2 ครั้ง ละครึ่ง 1 ชั่วโมง

1.3.7 แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราฟลาสต์หลอมเหลวในอัตราส่วน 1 : 1 เก็บในตู้อบที่

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.8 แช่ในพาราฟลาสต์หลอมเหลวจำนวน 3 ครั้ง ละครึ่ง 30 นาที

1.4 นำเนื้อเยื่อของกุ้งที่อินฟิเลตด้วยพาราฟลาสต์แล้วไปฝัง (Embed) ในพาราฟลาสต์ที่อยู่ในบล็อกสี่เหลี่ยม

1.5 ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องมือโครโตมแบบโรตารี (Rotary microtome) ให้แต่ละเซกชันมีความหนา 8 ไมครอนเรียงต่อกัน (Serial section) เป็นริบบิน (Ribbon)

1.6 นำเซกชัน (Section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชันไปวางบนหยดน้ำประมาณ 3-4 เซกชันต่อ 1 แถว แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยัดจนไม่มีการซ้อนทับของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกขับให้แห้งจะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงอยู่บนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.7 นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราฟาสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (Deparaffinization) โดยวางสไลด์ลงบนตะกร้า (Slide basket) แล้วนำไปจุ่มในโถแก้วที่บรรจุไซลีน และดึงนำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (Rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กันดังนี้

- 1.7.1 แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 1.7.2 แช่ในบิวทานอล 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.3 แช่ในเอทานอล 95% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.4 แช่ในเอทานอล 90% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.5 แช่ในเอทานอล 80% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.6 แช่ในเอทานอล 70% 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.7 ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7.8 แช่ในสารละลายฟอร์มาลินเข้มข้น 10% 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 นาที
- 1.7.9 ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 1.7.10 ล้างด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
- 1.7.11 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อออกโดยใช้ปั๊ม

สุญญากาศ (Vacuum pump)

2. วิธี indirect immunoperoxidase

2.1 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (Blocking)

- 2.1.1 หยดสารละลาย P_1^+ ให้คลุมแต่ละเซกชันด้วยไมโครปิเปต
- 2.1.2 บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

2.2 การใส่แอนติบอดีตัวแรก

- 2.2.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก
- 2.2.2 หยดแอนติบอดีตัวแรกให้คลุมแต่ละเซกชัน
- 2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
- 2.2.4 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- 2.2.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

2.3 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง

- 2.3.1 ดูด PBS ในแต่ละเซกชันออก
- 2.3.2 หยดแอนติบอดีตัวที่สอง (Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)) ที่เจือจาง 1 : 1000 ในสารละลาย P_1^+ ลงในทุกเซกชัน

2.3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3.4 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

2.3.5 แช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

2.4 นำเซกชันมาทำปฏิกิริยากับ 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 0.006% ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

2.5 ล้างเซกชันด้วยน้ำประปา 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที

3. การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอิโอซิน

3.1 ตี้น้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 70% 80% 90% และ 95% ครั้งละ 5 นาที

3.2 ย้อมทับด้วยสีอิโอซิน 0.02% ในเอทานอล 95% และล้างสีส่วนเกินออกด้วย เอทานอล 95%

3.3 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

3.4 แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ที่ผสมกับไซลีนในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 5 นาที

3.5 แช่ในไซลีนจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

3.6 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการฟีนิกสไลด์ (Mount) ด้วยตัวกลางฟีนิก (Permount)

3.7 นำสไลด์ที่ได้ไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล

ภาคผนวก ง

บัฟเฟอร์และสารเคมีสำหรับ Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. Lysis buffer (Flegel pers. Comm., 1998)

Tris-HCl, pH 9.0	50.00	มิลลิโมลาร์
EDTA	100.00	มิลลิโมลาร์
NaCl	50.00	มิลลิโมลาร์
20% SDS	100.00	มิลลิลิตร

2. Working solution

ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ (สัดส่วนนี้พอดีสำหรับตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง)

Poly(A)carrier RNA	50.00	ไมโครลิตร
Binding buffer	2.50	มิลลิลิตร

3. Poly(A)carrier RNA

Poly(A)carrier RNA	2.00	มิลลิกรัม
Elution buffer	0.50	มิลลิลิตร
ควรถูกเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

4. Binding buffer

เตรียมในปริมาตร	25.00	มิลลิลิตร
Guanidine-HCl	6.00	โมลาร์
Urea	10.00	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl	10.00	มิลลิโมลาร์
20% Triton X-100(v/v), pH 4	45.00	กรัม

5. Proteinase K

Lyophilized protinase K	90.00	มิลลิกรัม
Elution buffer	5.00	มิลลิลิตร
ควรถูกเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

6. Inhibitor removal buffer

เตรียมในปริมาตร	33.00	มิลลิลิตร
Guanidine-HCl	5.00	โมลาร์
Tris-HCl, pH 6.6	20.00	มิลลิโมลาร์

	เมื่อจะใช้เติมด้วย		
	เอทานอลบริสุทธิ์	20.00	มิลลิลิตร
7. Wash buffer			
	เตรียมในปริมาตร	20.00	มิลลิลิตร
	NaCl	20.00	มิลลิโมลาร์
	Tris-HCl, pH 7.5	2.00	มิลลิโมลาร์
	เมื่อจะใช้เติมด้วย		
	เอทานอลบริสุทธิ์	40.00	มิลลิลิตร
8. Elution buffer			
	Nuclease free double distilled water	30.00	มิลลิลิตร
	16 X 10 TBE buffer, pH 8.3		
	Tris-base	100.00	กรัม
	Boric acid	55.00	กรัม
	EDTA	9.50	กรัม
	Distilled water	1,000.00	มิลลิลิตร
	ปรับ pH ด้วยกรด HCl		
9. Ethidium bromide			
	Ethidium bromide	20.00	ไมโครลิตร
	Distilled water	400.00	มิลลิลิตร

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวฝน ต้นสกุล
วันเดือนปีเกิด	19 พฤษภาคม 2523
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 186 หมู่ 14 แขวงบางระมาด เขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานคร 10170
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	ครูผู้ช่วย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนบ้านศาลเจ้าพ่อ ตำบลวังน้ำเขียว อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา 30370
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2544	วท.บ. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2550	กศ.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร