

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2547

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสกลุ่มโรคหัวเหลือง
ในกุ้งกุลาดำแบบแถบสี

Development diagnostic kit for detection of
yellow head virus (YHV), gill associated virus (GAV)
in *Penaeus monodon* : Strip test

18 พ.ค. 2549

ไพศาล สิทธิกรกุล ศิวาพร ลงยันต์ สมบัติ รักประทานพร
ปรินทร์ ชัยวิสุทธิธำรง และ วีระวรรณ สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสกลุ่มโรคหัดเหลืองในกึ่งกลาดำแบบแถบสีเป็นโครงการย่อยของชุดโครงการวิจัยเรื่อง การตรวจวินิจฉัยและการป้องกันโรคไวรัสในกึ่งกลาดำและเป็นโครงการต่อเนื่องจากการพัฒนาชุดตรวจแบบ sandwich ELISA เพื่อพัฒนาชุดตรวจที่สามารถใช้ได้ง่ายและลดขั้นตอนต่าง ๆ ลง สามารถใช้โดยบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความจำเป็นต้องมีความรู้ทางวิทยาศาสตร์และสามารถนำออกใช้ในภาคสนามได้ทุกแห่ง นอกจากนี้ผลการตรวจยังสามารถรู้ผลได้ทันทีโดยใช้เวลาเพียงประมาณ 1 นาที โดยโครงการนี้เป็นการประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถผลิตได้ในห้องปฏิบัติการของคณะผู้วิจัยมาพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจง่าย ๆ ที่เกษตรกรและบุคคลทั่วไปสามารถใช้ได้และในโครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาชุดตรวจโรคหัดเหลืองที่ก่อโรครุนแรงในประเทศไทยสำเร็จ ในโครงการวิจัยงบประมาณปี 2547 โดยปรับเปลี่ยนโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อทำให้ชุดตรวจสามารถตรวจได้กว้างขวางขึ้น โดยสามารถใช้ตรวจสอบไวรัสกลุ่มโรคหัดเหลืองที่พบในประเทศไทยและ gill associated virus ในประเทศออสเตรเลีย และได้ใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยาเตรียมแอนติเจนทำให้ชุดตรวจปราศจากปฏิกิริยากับแอนติเจนของกึ่งซึ่งอาจก่อให้เกิดการวินิจฉัยผิดพลาดได้ แต่อย่างไรก็ดีชุดตรวจนี้สามารถใช้ได้ง่ายก็จริงแต่ก็ต้องแลกกับข้อด้อยบางประการของเทคนิคได้แก่ ความไวของเทคนิคย่อมลดลงเนื่องจากการตรวจสอบด้วยตา และใช้สารที่ก่อให้เกิดสัติดฉลากโดยตรงกับแอนติบอดีทำให้ไม่มีการขยายสัญญาณให้เพิ่มขึ้น ดังนั้นชุดตรวจนี้จึงสามารถใช้ตรวจเพื่อยืนยันผลการติดเชื้อและคัดเลือกกึ่งที่มีการติดเชื้อเบื้องต้นในกึ่งแต่ละตัวสำหรับกึ่งที่มีการติดเชื้อพอสมควรเท่านั้น ในกรณีที่ให้ผลลบควรมีการยืนยันสภาพปลอดเชื้อโดยวิธี RT-PCR อีกครั้ง

ในโอกาสนี้คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ ฝ่ายส่งเสริมการวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับโครงการนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ และคุณนิลวรรณ เพชรบุรณิน ประธานบริษัท Pacific Biotech Co. Ltd. และพนักงานที่ให้ความช่วยเหลือในการประกอบชุดตรวจซึ่งทำให้การผลิตชุดตรวจได้ผลอย่างดี ศ.ดร.ทิม เฟลเกล และ ดร.นุสรา ดิลกรัตนา ในความอนุเคราะห์ *E. coli* ที่มีการแสดงออกของยีน p20 ของไวรัสโรคหัดเหลืองเพื่อเตรียมโปรตีนนี้สำหรับผลิตแอนติซีรัม

คณะผู้วิจัย
สิงหาคม 2548

สารบัญ

หน้า

บทนำ	1
โรคหัวเหลือง	2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีการทดลอง	12
สัตว์ทดลอง	13
การเตรียมตัวอย่าง haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV	13
การเตรียม recombinant capsid protein ของ YHV	13
การเตรียม rabbit anti rYHV capsid antibody	14
การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blot	15
และ immunohistochemistry	
การเตรียม MAb ปริมาณมาก	15
การเตรียม Y19 antibody colloidal gold conjugate	16
การประกอบชุดทดสอบ	16
การตรวจสอบความไวของ strip test	16
การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR	17
การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วยวิธี dot-blot	17
ผลการทดลอง	19
สรุปผลการทดลอง	25
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	33

สารบัญรูป

รูปที่

หน้า

1	กึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง	3
2	เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง	4
3	Electron microscope แสดงลักษณะของไวรัสหัวเหลือง	6
4	แผนภูมิแสดงสรุปการทดลอง	18
5	SDS-PAGE และ Western blot ของ <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> ที่มี plasmid rYHV capid protein ที่ทำให้บริสุทธิ์	22
6	Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของกึ่งกลาดำ	23
7	RT-PCR ของhaemolymph จากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ YHV	24
8	ขั้นตอนการใช้ชุดตรวจสอบไวรัส YHV/ GAV ชนิดแถบสี	27



บทคัดย่อ

ไวรัสกลุ่มโรคหัวเหลือง (yellow head virus complex) ประกอบด้วย yellow head virus (YHV) ที่พบในประเทศไทย gill associated virus (GAV) พบในประเทศออสเตรเลีย และไวรัสหลายสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรครุนแรง การศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาชุดตรวจไวรัสกลุ่มโรคหัวเหลือง (YHV/GAV) ชนิดแถบสีทำโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 เชื่อมต่อกับ colloidal gold ใส่ในแผ่นดูดซับประกอบด้านหนึ่งของแถบ nitrocellulose membrane ที่มี rabbit anti recombinant capsid protein antibody และ goat anti mouse IgG antibody ตรึงขวางอยู่เป็นขีดตามลำดับ อีกด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane มีแผ่นดูดซับเพื่อใช้สำหรับดูดซับสารละลายที่มาจากแผ่นดูดซับด้านแรกและนำมาประกอบในดิสก์พลาสติก บรรจุในถุงพลาสติกป้องกันความชื้นเพื่อสะดวกในการเก็บรักษาและใช้ วิธีการใช้ชุดตรวจสามารถทำได้โดยง่ายโดยการดูดสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดประมาณ 100 ไมโครลิตรเข้าในเข็มฉีดยาและดูดเลือดกึ่งที่ต้องการตรวจ ผสมกันก่อนหยดใส่ในช่องบนแผ่นดูดซับส่วนแรกและปล่อยให้สารละลายไหลผ่าน nitrocellulose membrane ไปยังแผ่นดูดซับอีกด้านหนึ่ง ถ้าปรากฏสีม่วงแดง 2 แถบบนแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แสดงว่าตัวอย่างมีการติดเชื้อ YHV วิธีนี้สามารถใช้ตรวจตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ กุ้ง เช่น เหงือก ขาเดิน และขำวายน้ำ ได้โดยการบดตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมให้และดูดเฉพาะส่วนน้ำใสมาทดสอบ สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างกุ้งแต่ละตัวได้ แต่วิธีนี้มีความไวต่ำกว่า one step RT-PCR ประมาณ 200 เท่า จึงสามารถใช้ในการคัดเลือกกุ้งที่ติดเชื้อเบื้องต้นและยืนยันผลการติดเชื้อ YHV/GAV แต่ข้อดีของวิธีการนี้ได้แก่ ความง่าย สะดวก รวดเร็ว ในการตรวจโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือใด ๆ สามารถทำได้โดยเกษตรกรและบุคคลทั่วไปได้ และคาดว่า จะสามารถใช้ตรวจ YHV สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ทั้งที่พบในประเทศไทยและ GAV ที่พบในประเทศออสเตรเลีย

ABSTRACT

Yellow head virus complex consists of yellow head virus (YHV) in Thailand, gill associated virus (GAV) in Australia and several non virulent strains. This study was to develop a simple strip test kit for yellow head virus complex (YHV/GAV) using monoclonal antibody Y19 (against 20 kD capsid protein) colloidal gold conjugated. The conjugated antibody was placed on the sample absorbing pad at the end of nitrocellulose membrane strip (3.5 X 60 mm) and rabbit anti recombinant capsid protein (rp20) antibody and goat anti mouse Ig were streaked across on the nitrocellulose membrane consecutively. Another absorbing pad was assembly at the opposite end of nitrocellulose strip for collecting the test solution. The ready to use strip was held in a plastic case for convenient usage and storage and stored in desiccated plastic bag. About 100 µl of haemolymph from shrimp was withdrawn into a syringe and mixed with ~100 µl of anti-coagulant, then about 100 µl of the mixture was applied to the sample receptacle chamber and let the solution flow pass through the nitrocellulose membrane to the other end. The positive sample will show red purple bands at the test line (T) and control line (C). Sample of homogenate shrimp tissue can be used by applying the supernatant instead of haemolymph. The sensitivity of this method was about 200 times lowers than that of one step RT-PCR. Therefore, it can be used for primary screening of individual shrimp and confirmation of the YHV infection. The beneficial features of this kit are simple and fast and it can be used by any people without any additional tool or equipment. This kit was expected to detect GAV as well, since the monoclonal antibody can cross react with GAV very well.

บทนำ



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

โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลืองเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง (YHV) มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เป็นการค้าไม่เฉพาะประเทศไทยเท่านั้น ยังรวมไปถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮาวาย และประเทศแถบตะวันตก (Lu et al., 1994, 1995) โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำมีรายงานครั้งแรกบริเวณภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศ เมื่อปี 2533 ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การระบาดของโรคหัวเหลืองบริเวณภาคใต้ของประเทศพบครั้งแรกจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงต้นปี 2535 หลังจากนั้นในราวปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม โรคหัวเหลืองได้แพร่ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณรอบทะเลสาบสงขลา และแพร่เข้าสู่จังหวัดปัตตานีในราวกลางเดือนมิถุนายน (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535) การตรวจลักษณะการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ สามารถตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในบริเวณ

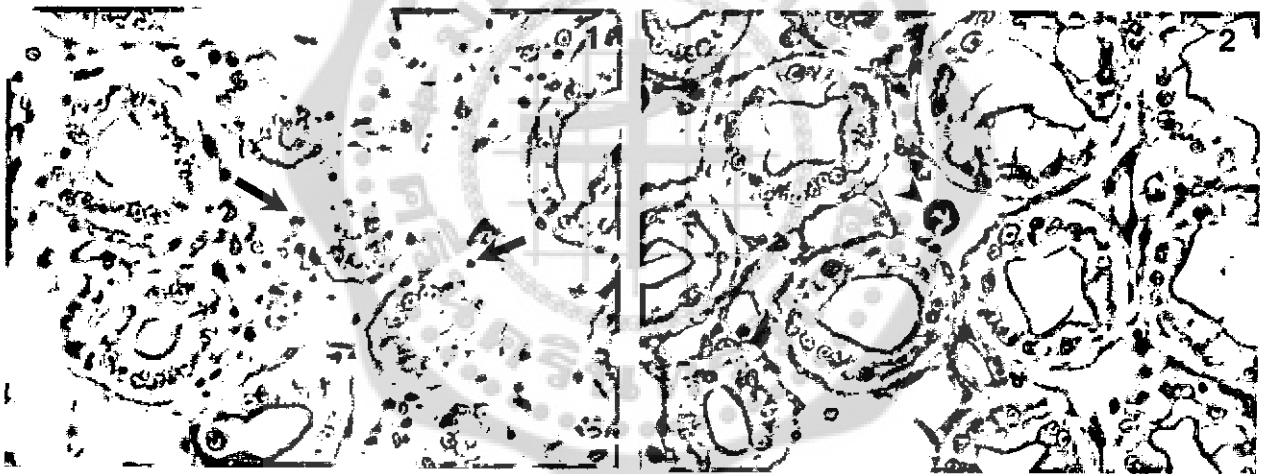
เหงือก ในเซลล์เม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง ในกุ้งที่ปรากฏอาการเป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งทำให้ส่วนหัวดับ-ดับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลืองเห็นได้ชัดเจน พยาธิสภาพของกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ ถ้ากุ้งได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะมีอาการอื่น ๆ ร่วมด้วยโดยจะส่งผลให้มีอัตราการตาย 100% ภายใน 3-5 วันหลังจากได้รับเชื้อซึ่งทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก (ชลอ ลัมสุวรรณ. 2543 ; สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)

สำหรับกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลืองจะมีลักษณะอาการดังนี้คือ กุ้งมาเกยอยู่บริเวณขอบบ่อ การกินอาหารจะลดลงจนผิดสังเกต กุ้งมีอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรงดีด ลำตัวซีด ส่วนหัวซึ่งเป็นส่วนดับ ดับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลือง (รูปที่ 1) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในวันที่สองหลังจากที่เริ่มเห็นอาการของโรค กุ้งจะตายเพิ่มขึ้นประมาณ 50% และ 70% ในวันที่สาม กุ้งจะตายหมดหรือเกือบหมดในวันที่สี่และห้าหลังจากเริ่มมีอาการให้เห็น (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)



รูปที่ 1 กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง (ซ้าย) สังเกตบริเวณหัวซึ่งเป็นส่วนของดับ-ดับอ่อนและเหงือกมีสีเหลืองและซีดกว่ากุ้งกุลาดำปกติ (ขวา)

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



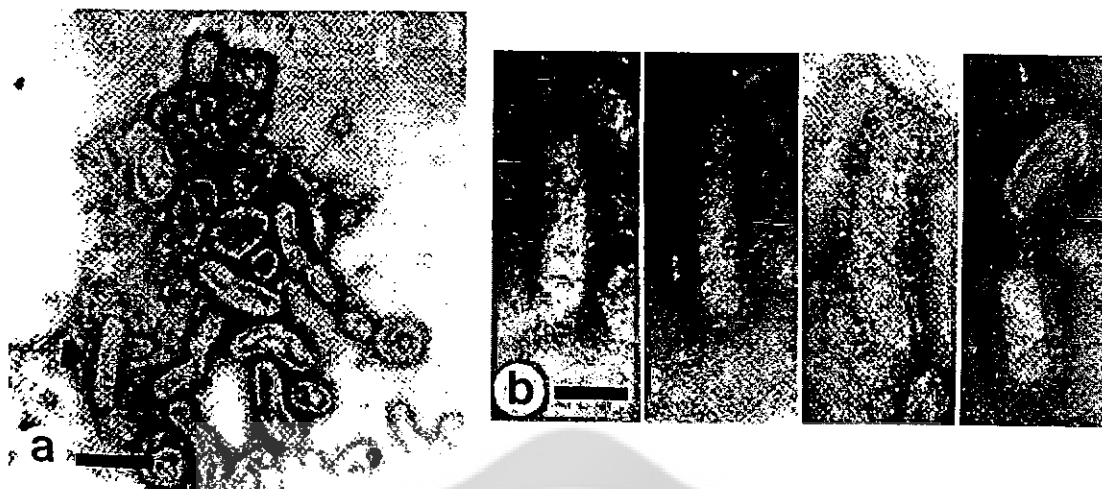
รูปที่ 2 เนื้อเยื่อบริเวณตับ-ตับอ่อนของกึ่งกลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง (1) การตรวจสอบด้วยวิธีทาง histology เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะเห็นลักษณะของนิวเคลียสรวมกัน (pycnotic nuclei) (ลูกศร) (2) การตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry เซลล์ที่พบไวรัสจะติดสีน้ำตาลและแสดงความผิดปกติของนิวเคลียส (หัวลูกศร)

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

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

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

อื่น ๆ ที่เชื่อว่าอาจเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลืองก่อนปล่อยลูกกุ้งลงบ่อเลี้ยง ก็จะเป็นการป้องกันการระบาดของไวรัสหัว



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

เหลืองได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์เหล่านี้เข้ามาสู่ระบบการเลี้ยงกุ้ง อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันเหล่านี้ก็ไม่ใช่วิธีการที่ดีที่สุด เนื่องจาก ลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยงอาจได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองมาจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีเชื้ออยู่ก่อนแล้ว

การป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคหัวเหลือง ในปัจจุบันทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และลูกกุ้งวัยอ่อน ก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์ม โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจจับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งวิธีการนี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้ได้จำนวนมาก ทำให้ผู้ตรวจวินิจฉัยสามารถตรวจเชื้อไวรัสนี้ได้แม้จะมีปริมาณน้อย วิธีการนี้จะช่วยลดเวลาในการตรวจได้รวดเร็วมีความไวสูง (Wongteerasupaya et al., 1997) ถึงแม้ว่า RT-PCR จะเป็นเทคนิคที่ปัจจุบันได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะทางและบุคลากรที่มีความรู้ ความสามารถ และความชำนาญทางเทคนิค RT-PCR เป็นอย่างดี นอกจากนี้ราคาในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างค่อนข้างสูงในกรณีที่

ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากค่าตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทาง PCR มีราคาค่อนข้างสูง (ประมาณ 800 บาทต่อตัวอย่าง) ทั้งไม่สามารถรับรองความแม่นยำตลอดการนำผลมาเทียบเคียงกันระหว่างห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน และวิธีการสุ่มตัวอย่างที่จะนำมาตรวจวินิจฉัยก็แตกต่างกันไปด้วย หากมีผลการตรวจที่ขัดแย้งกัน อาจทำให้เกิดความสับสนขึ้นกับผู้ให้บริการได้ และส่งผลให้ผู้ให้บริการเกิดความไม่มั่นใจในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีนี้ และด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้เทคนิค RT-PCR มีข้อจำกัดในด้านการใช้

สำหรับวิธีตรวจอื่น ๆ อย่างเช่น การตรวจทางชิ้นเนื้อและพยาธิวิทยา (histopathology) และการตรวจโดยการดูอาการของโรค (symptomatic diagnosis) ก็ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ (Lightner and Redman, 1998) โดยทั่วไปแล้วตัวอย่างที่นำมาตรวจมักอยู่ในสภาพเสียหายเนื่องจากไม่ได้รับการเก็บรักษาอย่างถูกต้องและอาการของโรคมักจะมีอาการเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อแบคทีเรียอยู่ด้วย ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเหล่านี้ก็จะไม่ให้ผลที่น่าเชื่อถือในทางระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส YHV

เมื่อ 3 ปีที่ผ่านมาได้มีรายงานถึงการผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดีซีรัมเพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส YHV และ WSSV (Loh et al., 1997) โดยวิธี Western blot อย่างไรก็ตามการใช้โพลิโคลนอลแอนติบอดีซีรัมเพื่อการวินิจฉัยยังมีความไวต่ำและวิธี Western blot ก็ไม่เหมาะสมในการวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก

อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยสามารถประสบความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ YHV (Sithigorngul et al., 2000) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อโปรตีนส่วนประกอบของ YHV ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 116 kD ซึ่งคาดว่าจะเป็นส่วนของไกลโคโปรตีนที่เป็นเปลือกหุ้ม (envelope) ของ YHV (Nadala et al., 1997) โมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีนของ YHV ทั้งในสภาวะปกติ (native form) และในสภาวะที่ถูกทำให้เสียสภาพ (denatured form) และพบว่าแอนติบอดีนี้ไม่ทำปฏิกิริยาต่อเนื้อเยื่อจากกุ้งปกติซึ่งไม่ได้รับเชื้อ YHV

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

การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยตรงสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ YHV สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่ immunohistochemistry, dot blot และ Western blot แต่ในแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกันคือ

-Immunohistochemistry เป็นวิธีที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก สามารถใช้วินิจฉัย เนื้อเยื่อและ haemocyte ของกุ้งที่ติดเชื้อเพียงเล็กน้อยโดยที่กุ้งยังไม่แสดงอาการของโรค (Sithigorngul et al., 2000) แต่มีข้อจำกัดที่ว่าวิธีนี้ต้องทำในห้องปฏิบัติการ เพราะต้องผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยใช้ paraffin section ซึ่งกินเวลามากถึง 3 วัน สิ้นเปลืองแรงงานและสารเคมีมาก ไม่สะดวกในกรณีที่ต้องวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมาก และการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ต้องตรวจดูจาก section บาง ๆ สามารถตรวจดูได้เพียงบริเวณแคบ ๆ ถ้าการติดเชื้อมีน้อยอาจตรวจไม่พบ

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

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

การศึกษาในโครงการที่ผ่านมาเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไว โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัส ตรึงและรวบรวมไวรัสในหลุมของ ELISA plate แล้วจึงผ่านกระบวนการของ indirect immunoperoxidase method สำหรับตรวจสอบไวรัสทำให้สามารถใช้ตัวอย่างในการตรวจสอบปริมาณมากได้และทำได้ทั้งการตรวจไวรัสในเลือดหรือเนื้อเยื่อก็ได้ ซึ่งความไวในการตรวจใกล้เคียงกับวิธี RT-PCR (ไพศาล สิทธิกรกุลและคณะ 2546) แต่เนื่องจากวิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือหลายชิ้นได้แก่ 8 channel micropipette และ ELISA reader และการตรวจในแต่ละครั้งสามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนมาก (80-88 ตัวอย่าง) ต่อ plate ดังนั้นวิธีการตรวจนี้จึงเหมาะสำหรับทำในห้องปฏิบัติการสำหรับการศึกษาค้นคว้าจะเป็นการพัฒนาต่อไปให้ใช้ได้ง่ายขึ้นสำหรับเกษตรกรและบุคคลทั่ว ๆ ไปคล้ายกับชุดตรวจการตั้งครรภ์ซึ่งสามารถทราบผลได้ทันทีและใช้กับการตรวจที่ละตัวอย่างเท่านั้น

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wongteerasupaya et al. (1997) ได้พัฒนา RT-PCR สำหรับตรวจการติดเชื้อ YHV ใน กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยใช้ primer ขนาด 135 bp สามารถใช้ตรวจไวรัสปริมาณน้อยมากประมาณ 0.01 pg ของ YHV-RNA และตรวจพบไวรัสในเลือดกุ้งหลังจากฉีดด้วยสารสกัดจาก เหงือกกุ้งที่ติดเชื้อตั้งแต่ 6-12 ชั่วโมง

Cowley et al. (2002) ได้พัฒนาเทคนิค RT-nested PCR สำหรับตรวจสอบ gill associated virus (GAV) และ lymphoid organ virus (LOV) ซึ่งพบว่า *P. monodon* ในประเทศออสเตรเลียประมาณ 98 % ติดเชื้อไวรัสเหล่านี้

Tang et al. (2002) พัฒนาเทคนิค in situ hybridization โดยใช้ digoxigenin labeled geneprobe สำหรับตรวจสอบการติดเชื้อ YHV และ GAV ได้แสดงถึงความคล้ายคลึงกันระหว่างไวรัสสองชนิดนี้

Spann et al. (2003) ใช้เทคนิค in situ hybridization ในการตรวจสอบการติดเชื้อ GAV ในรูปเรื้อรังและแบบเฉียบพลันโดยการติดเชื้อแบบเรื้อรังจะพบการติดเชื้อใน lymphoid organ และในการติดเชื้อแบบเฉียบพลันจะมีการติดเชื้อในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วไปทั้งส่วนหัว

Cowley et al. (2004) พัฒนา multiple RT-nested PCR สามารถใช้แยกการติดเชื้อ YHV และ GAV ออกจากกันได้

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

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

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

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

Sithigorngul et al. (2002) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนของ YHV เพิ่มเติมขนาด 22, 67 และ 135 kD จากการปลูกภูมิคุ้มกันหนูเมาส์ด้วย YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV โดยการฉีด สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 4 กลุ่ม แอนติบอดีกลุ่มแรกสามารถจับกับ native protein ของ YHV ขณะที่

อีก 3 กลุ่มที่เหลือสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 67 และ 22 kD ทั้งในรูปของ native form และรูปของ denatured form แอนติบอดีทั้งหมดสามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ YHV โดยวิธี dot-blot และ immunohistochemistry อย่างไรก็ตามแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนขนาด 22 kD จะให้ผลการศึกษาด้วยวิธี immunohistochemistry ดีที่สุดในแง่ของความเข้มและความชัดในการย้อม

Soowannayan et al. (2003) ได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ YHV และ GAV จากแหล่งต่าง ๆ พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีบางตัว ได้แก่ Y18 และ Y19 สามารถตรวจการติดเชื้อ GAV จากประเทศออสเตรเลีย และไม่พบปฏิกิริยาในตัวอย่างจากอินเดียและ Ecuador

สำหรับการตรวจสอบการติดเชื้อ YHV โดยใช้ cell culture ของ lymphoid organ นั้นต้องใช้เวลาราว 3 วันจึงจะสังเกตเห็นอาการผิดปกติ (Assavalapsukul et al., 2003) ซึ่งเป็นวิธีการที่ยังคงค่อนข้างยุ่งยาก จึงยังคงใช้ได้เพียงสำหรับการศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง host กับไวรัส

สำหรับรายงานการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยโรคในกุ้ง มีการใช้ในการตรวจโรค WSSV ได้แก่ การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ VP28 protein ของ WSSV โดยการปลูกภูมิคุ้มกันหนูด้วย WSSV บริสุทธิ์ ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 โคลนที่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ WSSV ในเนื้อเยื่อด้วยวิธี immunohistochemistry (Poulos et al., 2001) สำหรับการผลิต โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ WSSV โดยใช้ recombinant VP28 สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 3 โคลนซึ่งสามารถนำไปพัฒนาติดสลากระหว่าง biotin สำหรับตรวจการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี antigen capture ELISA พบว่ามีความไวใกล้เคียงกับ PCR (Lui et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากไวรัสบริสุทธิ์ได้ 4 โคลนซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ WSSV โดยวิธี dot blot (Anil et al., 2002)

ในรายงานผลการทดลองพัฒนาชุดตรวจสอบ YHV โดย indirect sandwich ELISA โดยใช้ rabbit anti YHV เป็น capture antibody โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B และ Y19 เป็น detector antibody และ rabbit anti mouse IgG เป็น reporting antibody พบว่าความไวในการตรวจ YHV ใกล้เคียงกับ RT-PCR โดยมีความไวต่ำกว่าประมาณ 4-5 เท่าสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละอย่างน้อย 80 ตัวอย่าง/ภาชนะ ในราคาที่ต่ำ แต่ยังคงใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงในการตรวจสอบผล และต้องทำในห้องปฏิบัติการ (ไพศาล สิทธิกรกุลและคณะ 2546) ในรายงานการวิจัยปี 2547 (ไพศาล สิทธิกรกุลและคณะ 2547) นี้จึงเป็นการพัฒนาต่อจากวิธีการดังกล่าวเพื่อให้ได้ชุดตรวจที่ง่ายสามารถทำการทดสอบในภาคสนาม วัสดุรวดเร็ว ราคาไม่แพงและสามารถใช้ได้โดยบุคคลทั่ว ๆ ไป

Strip test ทำโดยใช้ rabbit antiserum ที่ทำให้บริสุทธิ์โดย protein A column มาชนิดตรึงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและ goat anti-mouse IgG antibody ชนิดตรึงเป็นแนวบริเวณถัดไป และนำ MAb V3-2B บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับ colloidal gold ใส่ลงในแผ่นดูดซับแอนติบอดี

จากปฏิกิริยา จากนั้นตัดแถบดังกล่าวออกเป็นแถบขนาด 3 มิลลิเมตร บรรจุลงในตลับพลาสติก ซึ่งวิธีใช้ต่อมาเพียงแต่เก็บตัวอย่างเลือดหรือบดเนื้อเยื่อในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมให้และหยดสารละลายที่ได้ลงในช่องรับตัวอย่างปล่อยให้สารละลายไหลประมาณ 2-3 นาที สังเกตผลได้ทันที ถ้าตัวอย่างติดเชื้อ YHV มากพอจะเกิดแถบสีม่วงแดง 2 แถบบริเวณ T และ C แต่ถ้าตัวอย่างไม่ติดเชื้อ YHV หรือติดน้อยกว่าที่จะตรวจสอบได้โดยวิธีนี้จะมีแถบเกิดที่บริเวณ C เพียงแถบเดียว

ชุดตรวจนี้จึงเป็นชุดตรวจที่ง่ายและสะดวก แต่มีข้อจำกัดในด้านความไวที่ต่ำกว่า RT-PCR ~ 200 เท่า และมีข้อบกพร่องเล็กน้อยเนื่องจาก rabbit anti YHV antibody ที่ผลิตขึ้นจากการใช้ YHV ที่ทำให้บริสุทธิ์สูง แต่ยังคงมีแอนติเจนจากกึ่งปะปนอยู่ทำให้ rabbit anti YHV antibody สามารถจับกับสารจากองค์ประกอบของเลือดเกิดเป็นแถบสีเทาขึ้นบริเวณ T ในตัวอย่างที่ให้ผลลบ ซึ่งถึงแม้ว่าสีจะแตกต่างกันก็ตาม แต่สำหรับผู้ที่ไม่คุ้นเคยอาจตีความเป็นผลบวกและชุดตรวจนี้ใช้ MAb V3-2B ซึ่งจับกับ virulent strain ของ YHV ในประเทศไทยเท่านั้น การติดเชื้อ YHV สายพันธุ์อื่นและ gill associated virus (GAV) ไม่สามารถใช้ตรวจได้

การทดลองครั้งนี้จึงเป็นการพัฒนาเพิ่มเติมโดยใช้ MAb Y19 ซึ่งสามารถจับ YHV ได้ทุกสายพันธุ์ที่พบและ GAV และใช้ recombinant protein ของ capsid 20 kD protein ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Timothy W. Flegel ซึ่งทำการ clone gene ของ capsid protein และสอดใส่ให้ *E. coli* และกระตุ้นให้มีการแสดงออก จากนั้นก็ทำให้บริสุทธิ์โดย SDS-PAGE เช่นกัน ทำให้การปนเปื้อนของแอนติเจนจึงมาจาก *E. coli* ไม่ใช่มาจากกึ่งจึงน่าจะลดปฏิกิริยาข้ามที่เกิดจาก rabbit anti YHV capsid protein ได้ จึงคาดว่าชุดตรวจชุดที่ปรับปรุงใหม่นี้น่าจะใช้ได้กว้างขวาง และคุณภาพดีกว่าเดิมโดยมีความไวใกล้เคียงกับชุดตรวจเดิม

วิธีการทดลอง



1. สัตว์ทดลอง

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

2. การเตรียมตัวอย่าง haemolymph ที่ติดเชื้อ YHV

นำกุ้งกุลาดำมาฉีดด้วย haemolymph ของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส YHV เจือจาง 1 : 1000 สังเกตการติดเชื้อประมาณ 2-3 วัน เลือกกุ้งที่แสดงอาการติดเชื้อนำมาเจาะเลือดผสมกับน้ำยาป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Rodriguez et al., 1995) ในอัตราส่วน 1 : 1 ปั่นแยกตะกอนและเซลล์เม็ดเลือดออกที่ 3000 g แบ่งเป็นส่วนย่อย ๆ หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -70°C

3. การเตรียม recombinant capsid protein ของ YHV

3.1 นำ *E. coli* ที่มี plasmid ของ capsid protein (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Professor Timothy Flegel CENTEX มหาวิทยาลัยมหิดล) เลี้ยงใน LB broth จนได้ปริมาณมากพอ เติม IPTG จนมีความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM เลี้ยงต่อไปอีกประมาณ 4 ช.ม. เพื่อกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ recombinant protein นำเชื้อไปแยกที่ 4000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนของแบคทีเรียแช่ในบัฟเฟอร์ (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea pH 8) จากนั้นนำไป sonicate จนเซลล์สลาย ปั่นที่ 1300 g เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส (lysate) สำหรับแยกโปรตีนที่ต้องการ

3.2 การทำให้บริสุทธิ์ rYHV capsid protein นำ lysate ของแบคทีเรียที่ได้มาเติม SDS และ mercaptoethanol ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4% และ 10% ตามลำดับ ต้มที่ 100°C เป็นเวลา 1 นาที แยกโปรตีนโดยใช้ 15 % SDS-PAGE หลังจากย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ตัดแถบโปรตีนของ rYHV capsid protein โดยเทียบกับ *E. coli* ที่ไม่มี plasmid และ identified การสร้างโปรตีนที่ถูกต้องโดยวิธี Western blot และใช้ MAb Y19 เป็นตัวตรวจสอบ นำแถบโปรตีนมาล้างสีออกจนใส แช่ใน 0.1% SDS และใส่ในถุง dialysis นำไปดึงโปรตีนออกจาก gel ใน Towbin buffer โดยใช้ Transblot apparatus (BioRad) ที่ 70 volt เป็น

เวลา 6 ชม. บั่นแยก gel ออกจากน้ำใสที่ 3000 g กำจัดเกลือและ SDS ออกโดย dialysis ในน้ำกลั่นและทำให้โปรตีนเข้มข้นโดยใช้ vacuum concentrator (Savant) หาปริมาณโปรตีนโดย Bradford แบ่งเป็นส่วน ๆ เก็บที่ -70°C

4. การเตรียม rabbit anti rYHV capsid antibody

4.1 นำ rYHV capsid protein ที่เตรียมได้จากข้อ 3 ผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 ฉีดให้กระต่ายขาวทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) และได้ผิวหนัง (intradermal injection) อีก 2 แห่งในอัตราประมาณ 5 มิลลิกรัม/ตัว ฉีดซ้ำทุก ๆ 2 สัปดาห์โดยผสมกับ incomplete Freund's adjuvant อีก 3 ครั้ง หลังจากฉีดครั้งที่ 4 จะะเล็ดจากใบหูกระต่ายทิ้งให้แข็งตัว นำมาบั่นแยกซีรัมออกที่ 3000 g เป็นเวลา 30 นาที

4.2 การทำให้บริสุทธิ์ rabbit anti rYHV capsid antibody นำ serum มาตกตะกอนด้วย 40 % saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 4°C บั่นที่ 3,000 g แยกตะกอนออกและนำไป dialyzed และละลายใน PBS จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ protein A column ผสมแอนติซีรัมกับ binding buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 ผ่าน protein A column ล้างด้วย binding buffer และเก็บแอนติบอดีโดยใช้ elution buffer จากนั้นนำไป dialyzed ด้วยน้ำกลั่นและทำให้เข้มข้นด้วย vacuum concentrator (Savant) เติม 5X PBS ในอัตราส่วน 5 : 1 ตรวจหาปริมาณโปรตีนโดย Bradford reagent แบ่งเป็นส่วน ๆ เก็บไว้ที่ -70°C

4.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความจำเพาะของ rabbit anti rYHV capsid antibody ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ rabbit anti rYHV capsid antibody ที่ทำให้บริสุทธิ์โดย ammonium sulfate และ protein A column โดย SDS-PAGE ตรวจสอบความจำเพาะของ rabbit anti rYHV capsid antibody โดย Western blot ของ *E. coli*, *E. coli* ที่มี plasmid, rYHV capsid protein ที่ทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.2, haemolymph จากกิ้งก่าและกิ้งที่ติดเชื้อ YHV เปรียบเทียบกับ MAb Y19 ซึ่งจำเพาะต่อองค์ประกอบส่วน capsid protein ของไวรัส YHV และ immunohistochemistry

5. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี Western blot และ immunohistochemistry

นำ *E. coli*, *E. coli* ที่มี plasmid, rYHV capsid protein ที่ทำให้บริสุทธิ์, haemolymph จากกึ่งปกติและกึ่งที่ติดเชื้อ YHV มาแยกด้วยกระบวนการ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) นำตัวอย่างในเจลส่วนหนึ่งไปย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 ตัวอย่างในเจลอีกส่วนหนึ่งนำไปย้ายโปรตีนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ Transblot Cell (BioRad) จากนั้นนำไปปฏิกิริยาใน rabbit anti-rYHV capsid protein antibody ที่เจือจางใน 5 % blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ 37 °C ล้างใน 0.5 % blotto 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปปฏิกิริยาต่ออีก 3 ชั่วโมงใน goat anti-rabbit IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAR-HRP-BioRad) เจือจาง 1 : 1,000 (ใน 5 % blotto, 40 % haemolymph ของกึ่งปกติ) หลังจากล้าง 4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไปทำปฏิกิริยาในสารละลาย 0.03 % diaminobenzidine, 0.006 % hydrogen peroxide (H₂O₂), 0.05 % cobalt chloride ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที

ส่วนการตรวจทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้โดยวิธี immunohistochemistry ทำโดยนำเนื้อเยื่อที่เตรียมใน paraffin section มาละลายพาราฟินออก หยดด้วย P₁⁺ (10 % calf bovine serum เจือจางใน PBS) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยดด้วย P₁⁺, rabbit anti-rYHV capsid protein antibody และย้อมด้วย GAR-HRP ย้อมซ้ำด้วย haematoxylin และ eosin แล้วทำเป็นสไลด์ถาวร

6. การเตรียม MAb Y19 ปริมาณมาก

นำ hybridoma clone Y19 มาเลี้ยงและ reclone เพื่อคัดเลือกโคลนที่สร้างแอนติบอดี ขยายเซลล์จนมีจำนวนประมาณ 50 ล้านเซลล์ บั่นแยกเซลล์นำไปเลี้ยงใน serum free medium โดยใช้ Techno mouse culture cartridge เก็บ culture fluid รวบรวมไว้ประมาณ 2 ลิตร ทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์โดยผ่าน protein A column จากนั้นตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้ โดย Western blot และ immunohistochemistry

7. การเตรียม Y19 antibody colloidal gold conjugate

เตรียม 1 % gold chloride ทำโดยนำ gold chloride มาต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาทีจนได้สารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติม 1 % sodium citrate ต้มต่อไปอีก 10 นาทีจนได้สารละลายมีสีม่วงแดงกึ่งให้เย็น จากนั้นผสมแอนติบอดี Y19 ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เติม 10 % BSA ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้เข้มข้นโดยการปั่นที่ 50,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตะกอนของแอนติบอดี Y19 colloidal gold conjugate ที่ได้ไปใช้ต่อไป

8. การประกอบชุดทดสอบ

8.1 การเตรียม absorbing pad และ colloidal gold conjugate antibody

นำแอนติบอดี Y19 colloidal gold conjugate ที่ได้จากข้อ 7 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นพ่นลงบนแผ่น sample pad ปริมาณ 2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง

8.2 การเตรียม nitrocellulose strip

นำ rabbit anti-rYHV capsid antibody ที่ได้จากข้อ 4 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาขีดบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสบริเวณ test line (T) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ส่วนอีกด้านหนึ่งขีดด้วย goat anti mouse IgG antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรปริมาณ 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตรบริเวณ control line (C) ทิ้งไว้ให้แห้ง (รูปที่ 4)

8.3 การประกอบชุดทดสอบ

นำแผ่น sample pad ที่ได้จากข้อ 8.1 และแผ่นไนโตรเซลลูโลสจากข้อ 8.2 มาประกอบกันโดยวางแผ่น sample pad ของ Y19 colloidal gold conjugate ไว้บนด้านหนึ่งของแผ่นไนโตรเซลลูโลสติดจากบริเวณที่ขีดด้วย rabbit anti rYHV capsid antibody ส่วนด้านตรงข้ามวาง absorbing pad สำหรับดูดซับสารละลายที่ใช้ทดสอบโดยวางติดจากบริเวณที่ขีดด้วย goat anti-mouse IgG antibody (รูปที่ 4) จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้น ๆ ขนาด 3.5 X 60 มิลลิเมตร แล้วนำมาประกอบใส่ตลับ (รูปที่ 8)

9. การตรวจสอบความไวของ strip test

นำ haemolymph ของกิ้งกือสีดำที่ติดเชื้อ YHV มาเจือจางระดับต่าง ๆ โดยใช้ haemolymph ของกิ้งกือดำเป็นตัว diluent หยดตัวอย่างที่ได้ปริมาณ 200 ไมโครลิตรลงใน

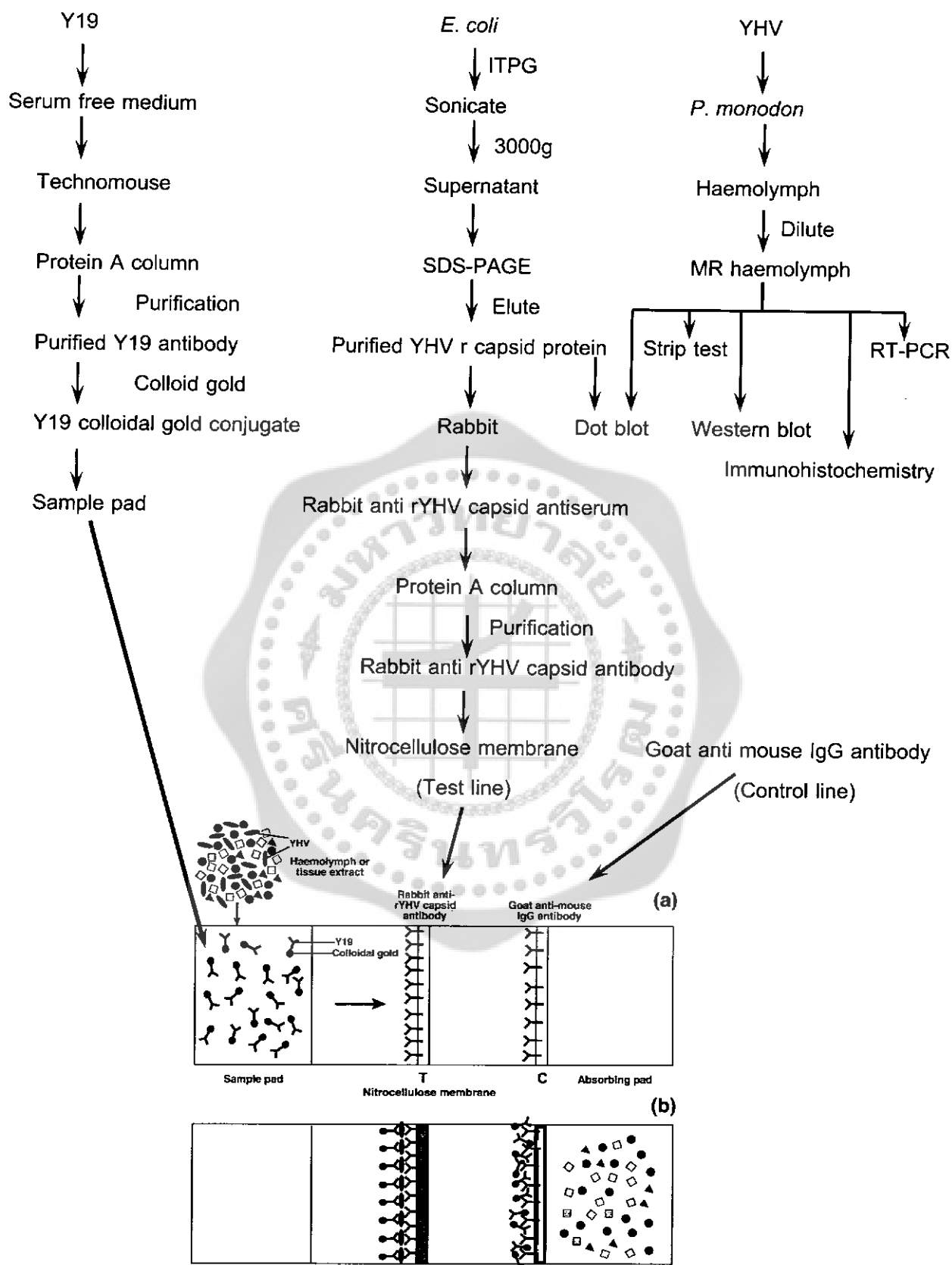
ช่อง วงรีของชุดทดสอบ ทั้งไว้ประมาณ 1-5 นาทีจึงนำมาตรวจผลโดยดูจากแถบสีม่วงแดงที่ปรากฏขึ้นในช่องแสดงผล ถ้าพบว่าปรากฏแถบสีม่วงแดง 2 แถบตรงกับตัวอักษร C และ T แสดงว่าให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าพบว่าปรากฏสีม่วงแดงแถบเดียวตรงกับตัวอักษร C แสดงว่าให้ผลเป็นลบ หรือมีการติดเชื้อ YHV ต่ำกว่าชุดทดสอบจะสามารถตรวจสอบได้

10. การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วย RT-PCR

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

11. การตรวจ YHV ใน haemolymph ด้วยวิธี dot-blot

นำ haemolymph ของกิ้งกูดล่าที่ติดเชื้อ YHV หรือ rYHV capsid protein มาเจือจางระดับต่าง ๆ ด้วย haemolymph ของกิ้งกูดรวมรวม หยดสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ 1 µl ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส บ่มในโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 หรือ rabbit anti rYHV capsid antibody และตามด้วย GAM-HRP หรือ GAR-HRP เช่นเดียวกับวิธี Western blot ตรวจปริมาณต่ำสุดของ haemolymph ของกิ้งกูดล่าที่ติดเชื้อ YHV หรือปริมาณต่ำสุดของ rYHV capsid protein ที่เจือจางซึ่งสามารถตรวจได้



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงสรุปการทดลอง



1. การเตรียมไวรัส YHV

จากการฉีด YHV ให้กึ่งกุลาดำประมาณ 120 ตัวสามารถเก็บ haemolymph ได้ 100 มิลลิลิตร ซึ่งให้ผลบวกชัดเจนกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 โดยการทดสอบด้วยวิธี dot blotting

2. การเตรียม rabbit anti rYHV capsid antiserum

จากการฉีด rYHV capsid protein ให้กระต่ายจำนวน 2 ตัว พบว่ากระต่ายทั้ง 2 ตัวมีการตอบสนองและสร้างแอนติบอดีต่อ YHV ในส่วนที่มีโปรตีนขนาด 20 kD ซึ่งเมื่อทดสอบด้วย haemolymph-SRBC conjugate แล้วไม่พบ cross reactivity กับโปรตีนอื่น ๆ ใน haemolymph จากกึ่งปกติและ haemolymph จากกึ่งปกติและ haemolymph จากกึ่งที่ติดเชื้อ (รูปที่ 5C) และเมื่อทดสอบโดยวิธี immunohistochemistry พบว่า rabbit anti rYHV capsid antiserum ที่ได้สามารถยับยั้งเนื้อเยื่อของกึ่งบริเวณที่ติดเชื้อ YHV ได้ (รูปที่ 6) สามารถเก็บ serum ของกระต่ายได้ประมาณ 100 มิลลิลิตรและทำให้แอนติบอดีบริสุทธิ์ประมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรได้จำนวน 5 มิลลิลิตร

3. การเตรียม MAb Y19

จาก culture fluid ที่เก็บจาก Technomouse ประมาณ 2 ลิตร หลังจากผ่าน protein A column แล้วได้แอนติบอดี Y19 ความเข้มข้น 10.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประมาณ 4 มิลลิลิตร เมื่อแบ่งมาทดสอบความจำเพาะโดย Western blot และ immunohistochemistry ที่ความเข้มข้น 1 : 50,000 พบว่ามีความจำเพาะคงเดิมคล้ายกับ rabbit anti rYHV capsid antibody (รูปที่ 5B)

4. การเตรียม Y19 antibody เชื่อมต่อกับ colloidal gold

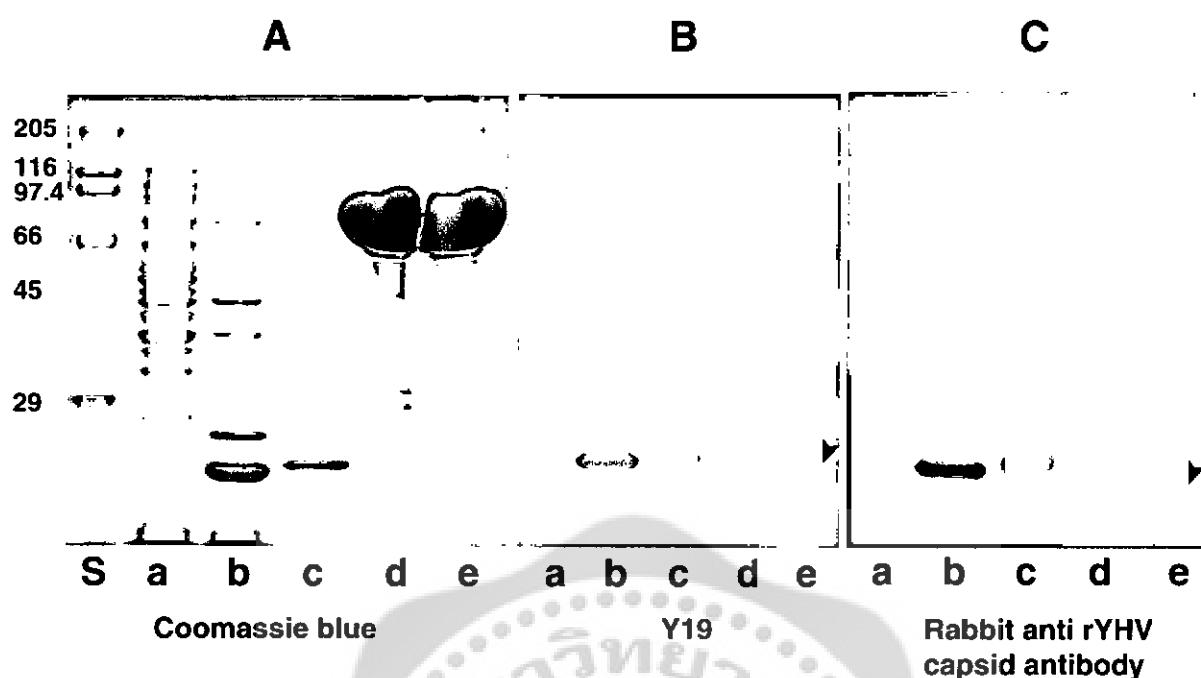
ใช้ Y19 antibody ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 3 มิลลิลิตร นำมาเชื่อมต่อกับ colloidal gold หลังจากทำให้เข้มข้นแล้ว สามารถนำมาผลิต strip test ได้จำนวน 1,400 ชุด

5. การทดสอบความไวของการตรวจหา YHV โดย strip test

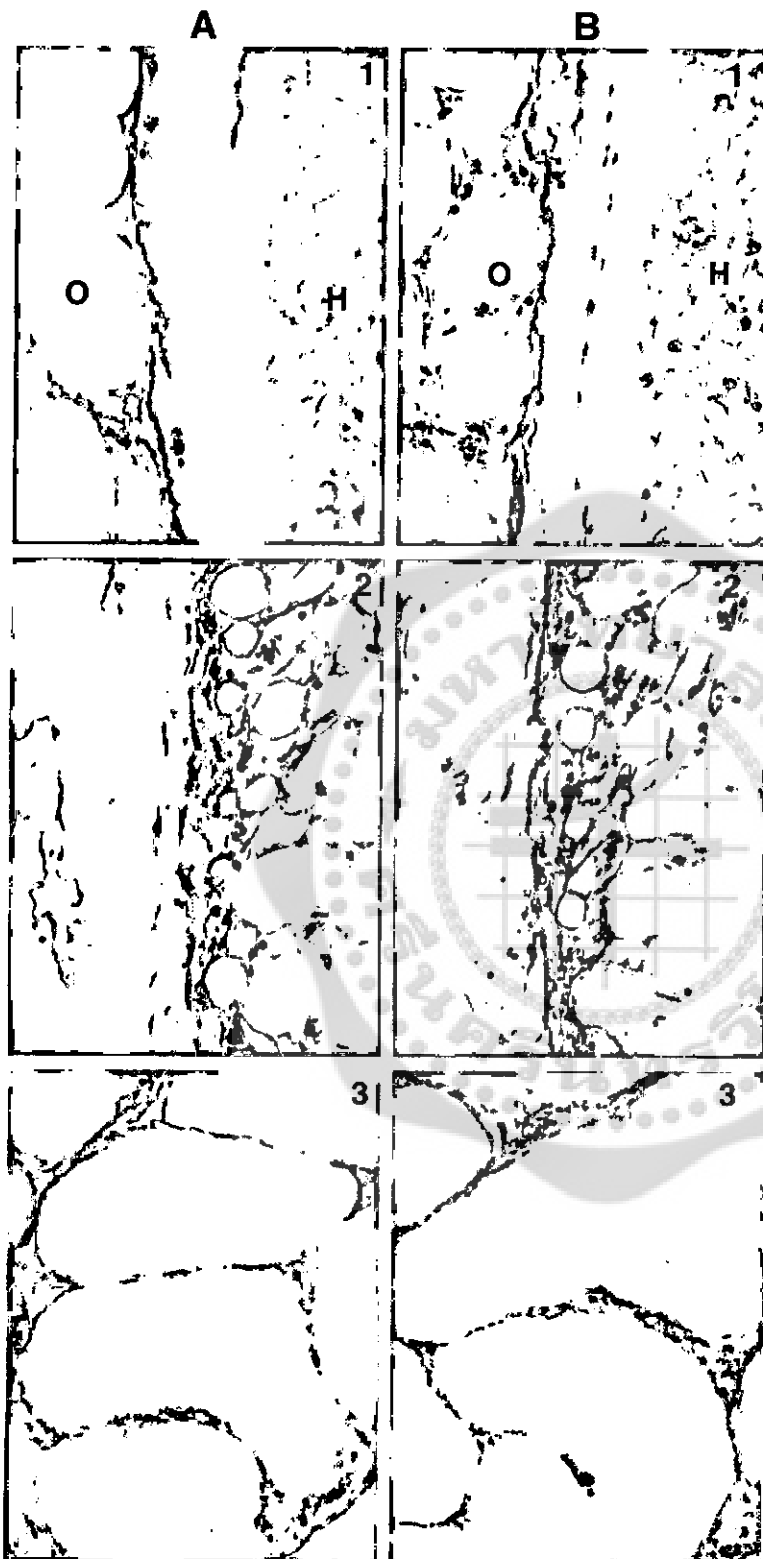
จากการเจือจาง haemolymph ของกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อ YHV ด้วย haemolymph ของกึ่งก้ามกราม เมื่อนำมาทดสอบกับ strip พบว่าสามารถตรวจสอบได้ดีชัดเจนที่ 1 : 1000

สำหรับที่ 1 : 5000 ให้ผลบวกก่อนข้างข้างแต่ก็สามารถสังเกตความแตกต่างจาก negative control (*M. rosenbergii* haemolymph) ซึ่งมีความไวใกล้เคียงกับ strip test สำหรับ YHV ที่พัฒนาครั้งก่อนนี้ เมื่อเทียบกับวิธี RT-PCT สามารถเห็นผลบวกจากที่ haemolymph เจือจางถึง 1 : 1,000,000 เท่า ดังนั้นวิธีใช้ strip test จึงมีความไวต่ำกว่าวิธี RT-PCR ประมาณ 200 เท่าและมีความไวต่ำกว่าวิธี indirect immunoperoxidase sandwich ELISA ในการทดลองที่แล้วประมาณ 40 เท่า ความไวของชุดทดสอบเทียบเคียงกับวิธี dot blot immunoperoxidase method แต่สะดวกและทราบผลเร็วกว่ามาก

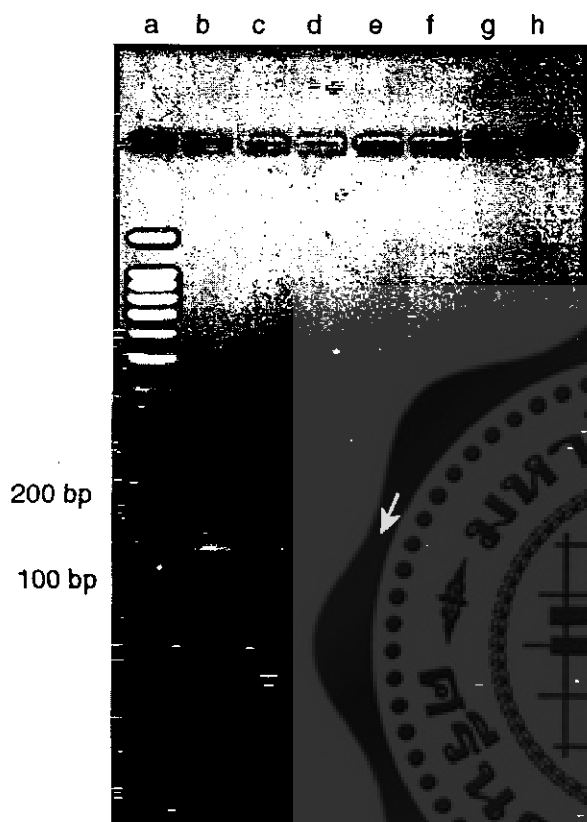




รูปที่ 5 SDS-PAGE (A) และ Western blot (B-C) ของ *E. coli* (a), *E. coli* ที่มี plasmid (b), rYHV capsid protein ที่ทำให้บริสุทธิ์ (c), haemolymph จากกิ้งก่าดำปกติ (d) และกิ้งก่าดำที่ติดเชื้อ YHV (e) ตัวเลขด้านซ้ายมือเป็นน้ำหนักโมเลกุล (kD) ของโปรตีนมาตรฐาน (A) เจลที่ย้อมด้วย Coomassie blue Western blot ที่ย้อมด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 (B) และ rabbit anti rYHV capsid antibody (C) s = โปรตีนมาตรฐาน h = haemocyanin Rabbit anti rYHV capsid antibody และโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 มีความจำเพาะต่อ YHV สูงดังผลการตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยแอนติบอดีที่ 2 สามารถจับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 20 kD (หัวลูกศร)



รูปที่ 6 Immunohistochemistry
ของเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ
ของกุ้งกุลาดำ (1) รังไข่ (O)
และหัวใจ (H) (2) ตับ-ตับ
อ่อน (hepatopancreas) และ
(3) midgut โดยใช้ (A) โมโน
โคลนอลแอนติบอดี Y19 (b)
rabbit anti rYHV capsid
antibody สามารถย้อม
บริเวณที่ติดเชื้อ YHV (ติดเชื้อ
น้ำตาล) ได้ดี



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

สรุปผลการทดลอง



ได้ทำการพัฒนาชุดตรวจไวรัส YHV แบบ strip test โดยใช้ rabbit anti rYHV capsid antibody เป็น capture antibody และ goat anti mouse IgG antibody เป็น positive control ชีดบน nitrocellulose membrane และใช้ Y19 antibody colloidal gold conjugate เป็น detector antibody สะสมบน sample pad วางบนด้านหนึ่งของ nitrocellulose membrane และด้านตรงข้ามวาง absorbing pad สำหรับดูดซับสารละลายที่ใช้ทดสอบวิธีการใช้แสดงดังรูปที่ 8

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

เนื่องจาก Y19 เป็นแอนติบอดีที่นอกจากจะจำเพาะต่อเชื้อ YHV สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงและไม่รุนแรงในประเทศไทยแล้วยังสามารถจับกับ gill associated virus (GAV) จากประเทศออสเตรเลียด้วยจึงคาดว่าจะสามารถใช้ตรวจเชื้อคล้าย YHV สายพันธุ์อื่นได้แก่ GAV หรือสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคในประเทศไทยได้

ชุดทดสอบไวรัส YHV/GAV ชนิดแถบสี (Strip test)

อุปกรณ์ประกอบด้วย

แท่งพลาสติกสำหรับบดเนื้อเยื่อ, เข็มฉีดยาสำหรับเจาะเลือด (syringe), สารเก็บตัวอย่าง, ดับทดสอบ (strip test)

ขั้นตอน

ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ

1) แบ่งสารเก็บตัวอย่างประมาณ 0.5 มล. ลงในหลอดที่เตรียมไว้ 2) ใช้กรรไกรตัดส่วนของเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจ เช่น หัวใจ, ส่วนปลายของขาว่ายน้ำ เนื้อเยื่อได้เปลือกส่วนหัวและลำตัว 3) ใช้ปากคีบ คีบเนื้อเยื่อลงในหลอดที่เตรียมไว้ บดเนื้อเยื่อในหลอดให้ละเอียดพอสมควร 4) ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสออกมา 0.1 มล. หยดลงในช่องวงรี (S) บนชุดแถบทดสอบ 5) ทิ้งไว้ประมาณ 1-15 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ (ไม่ควรอ่านผลหลังจากทิ้งไว้นานกว่า 30 นาที)

ตัวอย่างจากเลือด

1) ใช้เข็มฉีดยาดูดสารเก็บตัวอย่างในหลอดที่เตรียมไว้ประมาณ 0.2 มล. 2) ดูดเลือดออกจากช่องเลือดบริเวณใต้ท้องหรือหัวใจประมาณ 0.1 มล. 3) ผสมสารเก็บตัวอย่างและเลือดให้เข้ากันโดยการดันก้านกระบอกฉีดขึ้นลง หรือตีเบา ๆ 4) หยดเลือดที่ผสมสารเก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้วประมาณ 0.1 มล. ลงในช่องวงรี (S) บนชุดแถบทดสอบ 5) ทิ้งไว้ประมาณ 1-15 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ (ไม่ควรอ่านผลหลังจากทิ้งไว้นานกว่า 30 นาที)

การอ่านผล

โดยดูแถบสีชมพูที่ปรากฏขึ้นในช่องแสดงผลของชุดแถบทดสอบ ถ้าพบว่าปรากฏแถบสีชมพู/ม่วง 2 แถบตรงกับตัวอักษร C (control) และ T (test) แสดงว่ากึ่งที่นำมาทำการทดสอบติดไวรัสโรคหัวเหลือง ถ้าพบว่าปรากฏสีชมพู/ม่วง แถบเดียวตรงกับตัวอักษร C (control) แสดงว่ากึ่งที่นำมาทดสอบไม่ติดไวรัสโรคหัวเหลืองหรือติดในระดับที่ต่ำกว่าความสามารถของแถบทดสอบที่จะตรวจจับได้

ข้อควรระวัง

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

2) ชุดตรวจภาคสนามนี้เหมาะสำหรับการวินิจฉัยโรคหัวเหลืองเบื้องต้นเท่านั้น หลังจากตรวจหากพบว่าได้ผลเป็นลบ ควรตรวจซ้ำด้วยวิธีการทาง RT-PCR หรือตรวจดูความผิดปกติของเนื้อเยื่อ (histology) เพื่อยืนยัน ผลอีกครั้ง

ประดิษฐ์โดย

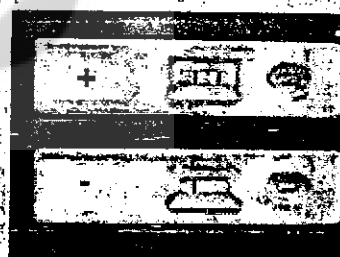
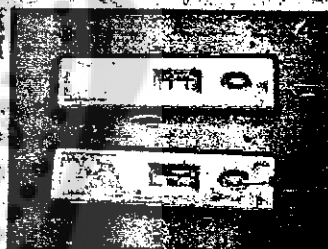
รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล ลิธิภัยกุล

ดร. ศิวาพร ลงยันต์

คุณสมบัติ รักประจักษ์พร ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล BIOTEC

คุณนิลวรรณ เพชรบุรณ์ใน Pacific Biotech Co., LTD.

**สนับสนุนทุนวิจัยโดย ฝ่ายวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



รูปที่ 8 ขั้นตอนการใช้ชุดตรวจสอบไวรัส YHV/GAV ชนิดแถบสี

เอกสารอ้างอิง

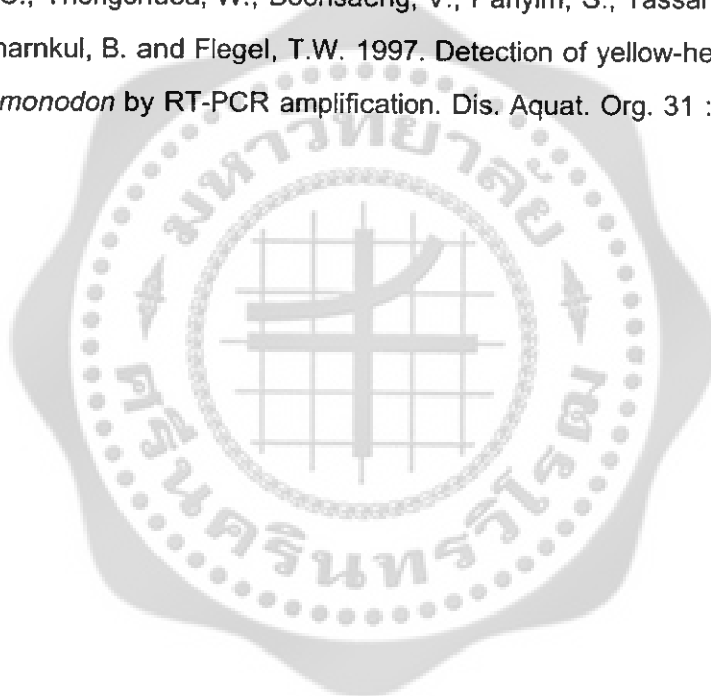


- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2543. กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ : เจริญรัตน์การพิมพ์.
- ไพศาล สิทธิกรกุล และคณะ. 2546. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีความไวและความแม่นยำสูงโดยวิธี Sandwich ELISA รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2545. 36 หน้า
- ไพศาล สิทธิกรกุล และคณะ. 2547. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำแบบแถบสี รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2546. 35 หน้า
- สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535. Baculovirus สาเหตุโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง ระหว่างวันที่ 16-19 กันยายน 2535 ณ ห้องประชุม สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. กรุงเทพฯ : 200-205.
- Anil, T.M., Shankar, K.M. and Mohan. C.V. 2002. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. Dis. Aquat. Org. 51 : 67-68.
- Boonyaratpalin, S., Supamataya, K., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U. and Chantanachookin, C. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow-head disease in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Pathol. 28 (3) : 103-109.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.
- Chantanachookin, C., Boonyaratpalin, S., Kasornchandra, J., Direkbusarakom, S., Ekpanithanpong, U., Supamataya, K., Sriurairatana, S. and Flegel, T. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. Dis. Aquat Org. 17 : 145-157.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Spann, K.M. and Walker, P.J. 2000. Gill-Associated virus of *Penaeus monodon* prawns : An invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. J. Gen Virol. 81 : 1473-1484.
- Cowley, J.A., Dimmock, C.M., Wongteerasuoaya, C., Boonsaeng, V. Panyim, S. and Walker, P.J. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. Dis. Aquat. Org. 36 : 153-157.

- Cowley, J.A., Cadogan L.C., Wongteerasupaya, C., Hadgson, R.A.J., Boonsaeng, V. and Walker, P.J. 2004. Multiplex RT-nested PCR differentiation of gill associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. J. Virol. Methods. 117 : 49-59.
- Flegel, T.W. and Sriurairatana, S. 1993. Black tiger prawn diseases in Thailand. Page 6 in D.M. Akiyama, editor. Technical Bulletin AQ39 1993/3, American Soybean Association, Singapore 0923.
- Flegel, T.W., Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. 1997. Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds), Diseases in Aquaculture III., Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. p 285-302.
- Javois, L.C. 1999. Immunocytochemical methods and protocols. Methods in molecular biology. V115 2nd ed. 465p.
- Jitrapakdee, S., Unajak, S., Sittidilokratana, N., Hodgson, R.A.J., Cowley, J.A., Walker, P., Panyim, D. and Boonsaeng, V. 2003. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoprotein of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. J. Gen. Virol. 84 : 863-873.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680-685.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnosis methods. Aquacultures. 164 : 201-220.
- Loh, P.C., Tapay, L.M., LU, Y. and Nadala, E.C.B. Jr. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. Advances in Virus Research .48 : 263-311.
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, J.A. and Loh, P.C. 1994. Infection of the yellow head baculo-like virus (YHB) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). J. Fish. Dis. 17: 649-656
- Lu, Y., Tapay, L.M. Brock, Loh, P.C. and Brock, J.A. 1995. Distribution of yellow head virus in selected tissue. Dis. Aquat. Org. 23 : 67-70.
- Lui, W., Wang, Y.T., Tian, D.S. Yin, Z.C. and Kwang, J. 2002. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelop protein (28 kDa). Dis. Aquat. Org. 49 : 11-18.

- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M., Cao, S. and Loh, P.C. 1997. Detection of yellow head virus and Chinese baculovirus in penaeid shrimp by the Western blot technique. *J. Virol. Meth.* 69 : 39-44.
- Nadala Jr., E.C.B., Tapay, L.M. and Loh, P.C. 1997. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Dis.Aquat.Org.* 31 : 141-146.
- Nadala Jr., E.C.B. and Loh, P.C. 2000. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp. *J. of Virol. Meth.* 175-179.
- Poulos, B.T., Kibler, R., Bradley-Dunlop, D., Mohny, L.L. and Lightner, D.V. 1999. Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 37 : 99-106.
- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aquilar, J. and Lightner, D.V. 2001. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 47 : 13-23.
- Rodriguez J., Boulo, V., Mialhe, E. and Bachere E. 1995. Characterisation of shrimp haemocyte and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell. Science.* 108 : 1043-1050.
- Sithigorngul, P., Chauychwong, P., Sithigorngul, W., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P. and Menasveta, P. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42 : 27-34.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sithigorngul, W. and Menasveta, P. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49 : 71-76.
- Soowannayan, C., Flegel, T.W., Sithigorngul, P., Sluter, J., Hyatt, A., Cramerri, S., Wise, I., Crane, M.St.J., Cowley, J.A., McCulloch, R.J. and Walk, P.J. 2003. Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. *Dis. Aquat. Org.* 57 : 193-200.
- Sittidilokratna, N., Hodgson, R.A.J., Panyim, S., Cowley, J.A., Jittrapakdee, S., Boonsaeng, V. and Walker P.J. 2002. The complete ORF1b-gene sequence indicates yellow-head virus is an invertebrate nidovirus. *Dis. Aquat. Org.* 50 : 87-93.
- Spann, K.M., McCulloch, R.J., Cowley, J.A., East, I.J. and Walker P.J. 2003. Detection of gill-association virus (GAV) by *In Situ* hybridization during acute and chronic infections of *Penaeus monodon* and *P. esculentus*. *Dis. Aquat. Org.* 56 : 1-10.

- Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 1998. A yellow-head virus probe : application to in situ hybridization and determination of its nucleotide sequence. *Dis. Aquat. Org.* 35 : 165-173.
- Tang , K.F.J., Span, K.M., Owens, L. and Lightner, D.V. 2002. *In situ* detection of Australian gill associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*. 205 : 1-5.
- Wongteerasupaya, C., Sriurairatana, S., Vickers, J.E., Anutara, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1995. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.* 22 : 45-50.
- Wongteerasupaya, C., Thongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) for *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.* 31 : 181-186.



ภาคผนวก

ผลงานได้เผยแพร่โดยการจัดอบรมให้ความรู้และฝึกปฏิบัติการแก่เกษตรกรและบุคลากร
จากหน่วยงานของรัฐและเอกชน โดยร่วมกับภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



การอบรมเชิงปฏิบัติการคลินิกเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยบูรพา
เรื่อง การตรวจไวรัสในกุ้งทะเลโดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดี
แก่ผู้ประกอบการ



วันที่ 4-5 มิถุนายน 2548

โดย สำนักบริการวิชาการ มหาวิทยาลัยบูรพา
ณ อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาวาริชศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี

สนับสนุนทุนโดย กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

กำหนดการอบรมเชิงปฏิบัติการคลินิกเทคโนโลยี
เรื่อง การตรวจไวรัสในก้นทะเลโดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดีแก่ผู้ประกอบการ
วันที่ 4-5 มิถุนายน 2548

ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี

วันเสาร์ที่ 4 มิถุนายน 2548

- 08.00 -08.30 น. ลงทะเบียน ณ ห้อง 4203 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
- 08.30 -08.45 น. พิธีเปิดการอบรม โดย อธิการบดี มหาวิทยาลัยบูรพา
- 08.45 – 9.15 น. อาหารว่าง
- 9.15 - 10.00 น. การบรรยายเรื่อง “ การระบาดของไวรัส/การตรวจไวรัสในก้นทะเล”
โดย ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา
- 10.00 – 12.00 น. การบรรยายเรื่อง “การวินิจฉัยโรคไวรัสในก้นทะเลด้วยเทคนิคทางแอนติบอดี”
โดย รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
- 12.00 – 13.00 น. อาหารกลางวัน
- 13.00 – 14.30 น. ปฏิบัติการตรวจตัวอย่างและวินิจฉัยโรคในก้นทะเล โดยเทคนิค ELISA
(ห้องปฏิบัติการอาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ 6208)
กลุ่มที่ 1 รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล
กลุ่มที่ 2 ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท
กลุ่มที่ 3 อ.ดร.ศิวาพร ลงยันต์
กลุ่มที่ 4 อ.ดร.พอลจิต วิโนทพรรษ์
- 14.30 - 14.45 น. อาหารว่าง
- 14.45 – 16.30 น. ปฏิบัติการตรวจตัวอย่างและวินิจฉัยโรคในก้นทะเล โดยเทคนิค dot-ELISA
และ เทคนิค immunohistochemistry
กลุ่มที่ 1 รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล
กลุ่มที่ 2 ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท
กลุ่มที่ 3 อ.ดร.ศิวาพร ลงยันต์
กลุ่มที่ 4 อ.ดร.พอลจิต วิโนทพรรษ์

วันอาทิตย์ที่ 5 มิถุนายน 2548

- 08.30 -10.15 น. (ต่อ) ปฏิบัติการตรวจตัวอย่างและวินิจฉัยโรคในกึ่งทะเล โดยเทคนิค dot-ELISA และ เทคนิค immunohistochemistry
ปฏิบัติการตรวจตัวอย่างและวินิจฉัยโรคในกึ่งทะเล โดยเทคนิค Western blot
กลุ่มที่ 1 รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล
กลุ่มที่ 2 ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท
กลุ่มที่ 3 อ.ดร.ศิวาพร ลงยันต์
กลุ่มที่ 4 อ.ดร.พอลจิต วิโนทพรรษ์
- 10.15 - 10.30 น. อาหารว่าง
- 10.30 – 12.00 น. (ต่อ) ปฏิบัติการตรวจตัวอย่างและวินิจฉัยโรคในกึ่งทะเล โดยเทคนิค Western blot
กลุ่มที่ 1 รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล
กลุ่มที่ 2 ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท
กลุ่มที่ 3 อ.ดร.ศิวาพร ลงยันต์
กลุ่มที่ 4 อ.ดร.พอลจิต วิโนทพรรษ์
- 12.00 – 13.00 น. อาหารกลางวัน
- 13.00 – 14.30 น. ปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคห้วเหลืองและตัวแดงดวงขาวโดยใช้ชุดตรวจด่วน (strip test)
- 1 กลุ่มที่ 1 รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล
กลุ่มที่ 2 ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท
กลุ่มที่ 3 อ.ดร.ศิวาพร ลงยันต์
กลุ่มที่ 4 อ.ดร.พอลจิต วิโนทพรรษ์
- 14.30 – 14.45 น. อาหารว่าง
- 14.45 - 16.30 น. สรุปและอภิปรายผลการตรวจตัวอย่างโดยเทคนิคต่าง ๆ
(ห้องปฏิบัติการอาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ 6207)
- 17.00 น. พิธีปิดการอบรม/ มอบประกาศนียบัตร

กำหนดการอบรมเชิงปฏิบัติการคลินิกเทคโนโลยี

เรื่อง การตรวจไวรัสในกึ่งทะเลโดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดีแก่ผู้ประกอบการ

วันเสาร์ที่ 4 มิถุนายน 2548

รศดรไพศาล/ผศดรปภาศิริ/สมบัติ

ดรศิวพร/ดรพอลจิต

13.00 – 14.30 น. IHC (ห้อง 6208)	กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 IHC กลุ่ม 3 และกลุ่ม 4	Dot-blot กลุ่ม 3 และกลุ่ม 4 Dot-blot กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2
14.30 - 14.45 น.	อาหารว่าง (ห้อง 6207)	
14.45 – 17.00 น. (ห้อง 6208)	Electrophoresis กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 /Western blot	ELISA กลุ่ม 3 และกลุ่ม 4

วันอาทิตย์ที่ 5 มิถุนายน 2548

รศดรไพศาล/ผศดรปภาศิริ/สมบัติ

ดรศิวพร/ดรพอลจิต

08.30 -9.30 น. (ห้อง 6208)	IHC/ Dot-blot กลุ่ม 1 กลุ่ม 2 ล้างตัวอย่างและเติม 2 nd antibody	IHC/ Dot-blot กลุ่ม 3 และ กลุ่ม 4 ล้างตัวอย่างและเติม 2 nd antibody
9.30-9.45 น.	อาหารว่าง	
9.45-12.00 น. (ห้อง 6208)	Electrophoresis กลุ่ม 3 และกลุ่ม 4 /Western blot	ELISA กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2
12.00-13.00 น.	อาหารเที่ยง (ห้อง 6207)	
13.00-14.30 น. (ห้อง 6208)	IHC/ Dot-blot กลุ่ม 1 กลุ่ม 2 ล้างตัวอย่างและเติมสารละลายสับสเตรท อ่านผลสไลด์จาก IHC จากกล้องจุลทรรศน์	IHC/ Dot-blot กลุ่ม 3 และ กลุ่ม 4 ล้างตัวอย่างและเติมสารละลายสับสเตรท
14.30-15.30 น. (ห้อง 6208)	ชุดตรวจด่วน Strip test กลุ่ม 1 กลุ่ม 2	ชุดตรวจด่วน Strip test กลุ่ม 3 และ กลุ่ม 4
15.30-17.00 น.	อาหารว่าง (ห้อง 6207) พิธีปิดการอบรม/ มอบประกาศนียบัตร	สรุปและอภิปรายผลการตรวจตัวอย่างโดยเทคนิคต่าง ๆ

โครงการอบรมคลินิกเทคโนโลยี

เรื่อง การฝึกอบรมการตรวจไวรัสในกึ่งทะเลโดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดีแก่ผู้ประกอบการ

ผู้จัดเจ้าของโครงการ ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท หัวหน้าโครงการและคณะ

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี

วันเวลา และสถานที่ วันที่ 4 – 5 มิถุนายน 2548 เวลา 8.00- 17.00 น

ณ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง จ.ชลบุรี

ผู้เข้ารับการอบรม 50 คน จาก

1. ผู้ประกอบการเลี้ยงกุ้งฟิ และผู้ประกอบการเลี้ยงกุ้งบ่อดิน จำนวน 15 คน
2. เจ้าหน้าที่กรมประมงและนักวิทยาศาสตร์ จำนวน 25 คน
3. วิสาหกิจชุมชน และเอกชน จำนวน 10 คน

วัตถุประสงค์ของโครงการ:

1. เพื่อสร้างความร่วมมือระหว่างมหาวิทยาลัยกับชุมชน และหน่วยงานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
2. เพื่อสร้างความรู้ความเข้าใจและทักษะทางวิทยาศาสตร์แก่เจ้าหน้าที่ของรัฐบาล วิสาหกิจ และบริษัทเอกชน ที่ดำเนินการตรวจไวรัสให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทะเลในภาคตะวันออก
3. เพื่อให้เจ้าหน้าที่ของรัฐบาล วิสาหกิจ และบริษัทเอกชน ที่มีคลินิกโรคสัตว์น้ำอยู่แล้วได้มี แนวทางวินิจฉัยเชื้อไวรัสวิธีใหม่ที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือ และสารเคมีที่มีราคาแพง

หลักการและเหตุผล:

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้เข้าสู่ประเทศไทยไม่ต่ำกว่าปีละ 50,000 ล้านบาทต่อปี แต่ปัจจุบันมีแนวโน้มลดลงเพราะการเลี้ยงกุ้งทะเลทุกภาคในประเทศไทย ได้ประสบ ปัญหาการตายของกุ้งทั้งส่วนของการเพาะฟัก การอนุบาล และการเลี้ยงในบ่อดิน ปัญหาการตายที่สำคัญที่สุดคือการตายอันเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ เช่น โรคหัวเหลือง โรคตัวแดงจุดขาว โรค ขี้ขาว โรคติดเชื้อไวรัสในตับ โรคเรืองแสงที่เกิดจากแบคทีเรีย และ โพรโตซัว (ชลอ 2534) เกษตรกร ควรมีความเข้าใจในเทคโนโลยี และความรู้ด้านโรคและเทคนิคทางภูมิคุ้มกันในการบ่งชี้สุขภาพของกุ้ง ทะเล เพื่อหาแนวทางป้องกันการตายของกุ้งจากการติดเชื้อต่างๆ โครงการคลินิกเทคโนโลยีมีความ ต้องการถ่ายทอดความรู้การตรวจไวรัสโดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดีซึ่งมีความสามารถตรวจจับไวรัสที่ ก่อการตายรุนแรงในการเลี้ยงกุ้งทะเล เช่น โรคไวรัสหัวเหลือง และไวรัสตัวแดงดวงขาว การตรวจไวรัสในหน่วยงานต่างๆจะใช้เทคนิคทาง PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคา แพง บุคคลที่ตรวจต้องได้รับการฝึกฝนเชี่ยวชาญอย่างมาก อย่างไรก็ตามการตรวจไวรัสยังมีแนวทาง อื่นคือการนำแอนติบอดีจากสัตว์ทดลองที่มีความจำเพาะต่อไวรัส ซึ่งเป็นเทคนิคที่ผู้ได้รับการอบรม

สามารถเรียนรู้ได้ง่าย และสามารถนำไปตรวจควบคู่กับเทคนิคทาง PCR หรือนำไปแทนที่ได้เลย มีหลายเทคนิคที่สามารถใช้แอนติบอดีในการตรวจตัวอย่าง เช่น เทคนิคอิมมูโนเคมีสทรี (Immunohistochemistry) ตรวจเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อ เทคนิคอีไลซ่า (ELISA, Enzyme Link Immuno-adsorbent assay) และเทคนิค Dot blot สำหรับตรวจเชื้อไวรัสในน้ำเลือดกึ่ง ดังนั้นการอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีคลินิกเชิงปฏิบัติการในครั้งนี้ ทำให้ผู้เข้ารับการอบรมทุกคนสามารถลงมือตรวจไวรัสด้วยตัวเองจริง ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยไวรัสในกึ่งทะเล รวมทั้งเป็นแนวทางการจัดตั้งคลินิกเทคโนโลยีประจำที่ มหาวิทยาลัยบูรพาต่อไป เพื่อเป็นศูนย์ถ่ายทอดความรู้ในภาคตะวันออก ให้บริการความรู้ให้แก่เจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบการให้บริการตรวจโรคกึ่งแก่เกษตรกร และช่วยตรวจสอบการปนเปื้อนไวรัสให้แก่เกษตรกรโดยตรง ทำให้ผลสุดท้ายให้เกิดเศรษฐกิจการผลิตกึ่งในภาคตะวันออกมีปริมาณสูงขึ้น นอกจากนี้การมีคลินิกเทคโนโลยีประจำที่ มหาวิทยาลัยบูรพา จะช่วยให้นิสิตคณะวิทยาศาสตร์ได้มีทักษะในการฝึกงานด้วย

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1 มีคลินิกเทคโนโลยีแห่งใหม่ของมหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้บริการความรู้ ทักษะ และตรวจตัวอย่างไวรัสกึ่งโดยตรงจากฟาร์มกึ่งทะเลของเกษตรกรในภาคตะวันออก รวมทั้งเป็นแหล่งฝึกงานของนิสิตด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
- 2 เจ้าหน้าที่ของรัฐหน่วยงานอื่นและเอกชนได้ความรู้ ทักษะ เทคนิคใหม่ไปเสริมการตรวจสอบที่มีอยู่เดิม เป็นการสร้างความร่วมมือกันระหว่างภาครัฐบาล เอกชน กับชุมชน
- 3 ความรู้และเทคนิคการตรวจโรคไวรัสแบบรวดเร็ว ได้เผยแพร่สู่ชุมชนแบบยั่งยืนอันเนื่องจากการเข้ารับการอบรมเชิงปฏิบัติการของเจ้าหน้าที่ภาครัฐบาล เอกชนและเกษตรกร
- 4 คาดว่าลูกกึ่งจะมีอัตราการอดสูงขึ้น และกึ่งเนื้อที่เลี้ยงมีผลผลิตรวมมากขึ้นในภาคตะวันออก
- 5 เพื่อก่อตั้งคลินิกโรคและสุขภาพสัตว์น้ำประจำที่วาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา จ.ชลบุรีต่อไป เพื่อตรวจเชื้อโรคในกึ่งทะเลและปลาเลี้ยงเศรษฐกิจ รวมทั้งให้คำปรึกษาทางวิชาการโดยตรงต่อผู้ประกอบการเลี้ยงกึ่งและเจ้าหน้าที่ของรัฐบาล วิชาชีพและบริษัทเอกชน และช่วยให้นิสิตภาคชีววาริชศาสตร์มีทักษะในการเข้ามาฝึกงาน

บทปฏิบัติการที่ 1

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ขั้นตอน

- 1.1. เคลือบหลุม 96-well plate ด้วย rabbit anti YHV antibody หรือ rabbit anti WSSV antibody ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน ในกล่องเก็บความชื้น
- 1.2. ล้างด้วย 0.5% blotto 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 1.3. เติม positive control และตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อสกัดที่ต้องการตรวจสอบหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง
- 1.4. ล้างด้วย 0.5% blotto 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 1.5. เติม MAb against YHV หรือ MAb against WSSV (1:200) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หรือบ่มที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน ในกล่องเก็บความชื้น
- 1.6. ล้างด้วย 0.5% blotto 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 1.7. เติม rabbit anti mouse Ig – HRP antibody (RAM-HRP) (1: 2,000) หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง
- 1.8. ล้างด้วย 0.5% blotto 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 1.9. เติมสารละลายสับสเตรท (o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H₂O₂ in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 N H₂SO₄ 100 ไมโครลิตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตรด้วย microplate reader

การเตรียมสารละลายและตัวอย่าง

1. 0.15 M Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	1,000	มิลลิลิตร

2. 0.5% blotto

- นมผงพร่องมันเนย (non – fat dry milk)	5.0	กรัม
- PBS buffer	1000.0	มิลลิลิตร

3. ตัวอย่างเลือด

เก็บน้ำเลือดจากกึ่งโดยใช้ Modified Alsever's solution (anti-coagulant) ผสม 1 %

Triton X-100 ในอัตราส่วน 1:1

Modified Alsever's solution

Sodium citrate	7.94	กรัม
Sodium chloride	19.64	กรัม
EDTA	3.35	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	1000.0	มิลลิลิตร

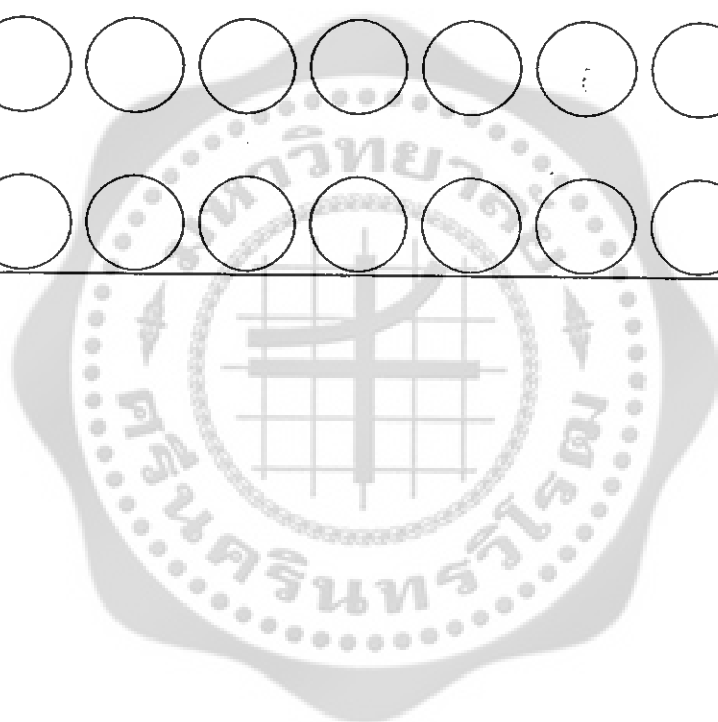
4. ตัวอย่างเนื้อเยื่อสัตว์

นำเนื้อเยื่อเหียงออกมาบดใน PBS 4 ชิ้น/มิลลิลิตรสำหรับกึ่งขนาด 15-20 กรัม ดูดน้ำส่วนใส
มาตรวจหาไวรัสต่อไป

5. Citrate Buffered 0.1 M, pH 4.5

Sodium citrate	29.4	กรัม
1% merthiolate	10	มิลลิลิตร
Distilled water	990	มิลลิลิตร
Adjust pH with 0.1 N NaOH or HCl		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐



ปฏิบัติการที่ 2

Immunohistochemistry

2.1. การเตรียมเนื้อเยื่อทางมีนุษยวิทยา

2.1.1. นำตัวอย่างสัตว์ มาตัดส่วนของเนื้อเยื่อและอวัยวะภายในไปทำให้คงรูป (Fix) ในสารละลาย Davidson's Fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.2 นำเนื้อเยื่อมาล้างด้วยน้ำสะอาดหลาย ๆ ครั้ง เพื่อกำจัด Davidson's Fixative ออก แล้วดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน และนอร์มัลบิวทานอลตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltration) ด้วยพาราฟลาสต์ ดังนี้

1. 70% Ethanol 3 ชั่วโมง
2. 90% Ethanol 3 ชั่วโมง
3. 95% Ethanol 2 ครั้ง ซ้ำมคิน
4. n-Butanol 1 ชั่วโมง
5. n-Butanol : Xylene (1:1) 1 ชั่วโมง
6. Xylene 1 1 ชั่วโมง
7. Xylene 2 1 ชั่วโมง
8. Xylene : Wax (1:1) 30 นาที
9. Wax 1 30 นาที
10. Wax 2 30 นาที
11. Wax 3 30 นาที
12. Embedding

2.1.3 ตัดเนื้อเยื่อสัตว์ที่ฝังอยู่ในพาราฟลาสต์ด้วยเครื่องไมโครโทมแบบโรตารี (rotary microtome) แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน นำเนื้อเยื่อที่ตัดมาติดบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วยสารละลายเจลาติน (gelatin coated) สไลด์ละ 3 ชิ้น แล้วนำไปอบในตู้อบ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 กระบวนการย้อมโดยวิธี immunohistochemistry

- 2.2.1 นำสไลด์ที่ติดเนื้อเยื่อมาละลายเอาพาราฟฟินออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดยวางสไลด์ลงในตะกร้า (slide basket) แล้วจุ่มลงในโถแก้วย้อมเนื้อเยื่อสัตว์ที่มี Xylene และ ethanol ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังรูปที่ 2.1
- 2.2.2 block เนื้อเยื่อด้วย p1* (10% calf bovine serum) เป็นเวลา 30 นาที
- 2.2.3 ย้อมเนื้อเยื่อด้วย MAb against YHV หรือ MAb against WSSV (1:50) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 2.2.4 ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 2.2.5 บ่มด้วย goat-anti-mouse-HRP antibody (1: 1000) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C
- 2.2.6 ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 2.2.7 develop ด้วยสารละลายสับสเตรท (0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% H₂O₂) เป็นเวลา 5 นาที บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะเกิดสีน้ำตาล
- 2.2.8 ย้อมสี Hematoxylin & Eosin คี้น้ำออก (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และ xylene
- 2.2.9 ทำสไลด์ถาวร ดังขั้นตอนสรุปใน รูปที่ 2.1

การเตรียมสารละลาย

1. Davidson's Fixative

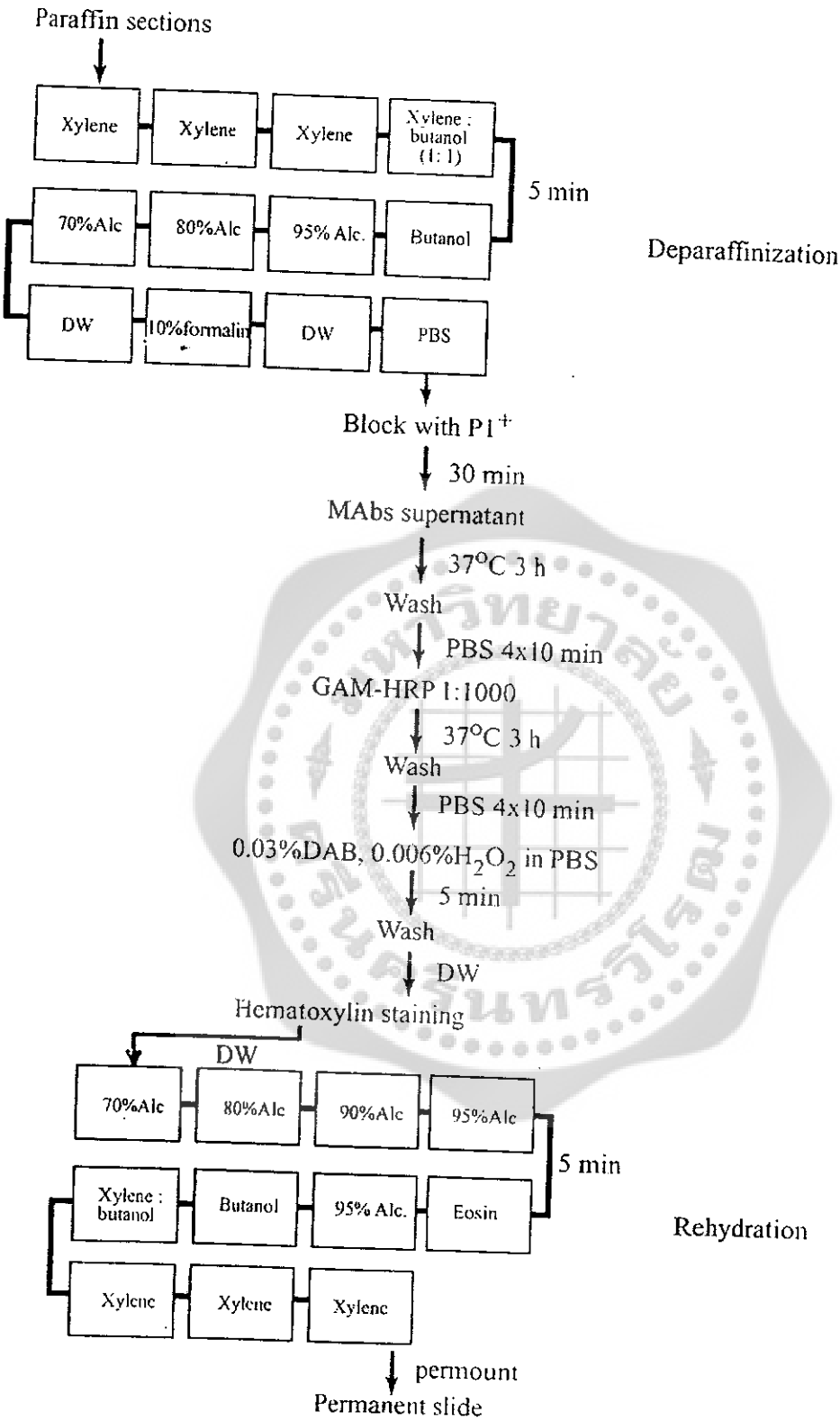
95% Ethanol	30	มิลลิลิตร
Formalin	20	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

2. Gelatin solution ใช้เคลือบสไลด์

Chrome alum	0.5	กรัม
ละลายน้ำ	100	มิลลิลิตร
อุ่นให้อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศา		
เติม Gelatin	1	กรัม

อุ่นจน gelatin ละลาย แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วใช้จุ่มเคลือบสไลด์ ตาม

ให้แห้ง



รูปที่ 2.1 Deparaffination, Immunohistochemistry และ dehydration

บทปฏิบัติการที่ 3

Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (dot-ELISA)

ขั้นตอน

- 3.1. นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาขีดเส้นเส้นเป็นตาราง ช่องละ 0.5x0.5 เซนติเมตร
- 3.2. นำตัวอย่างเลือด หรือเนื้อเยื่อสกัดมา ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตรหยดลงกลางช่อง ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำกระดาษมาแช่ใน 5% blotto เพื่อ block non-specific protein เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 3.3. นำกระดาษไปป้อนใน MAb against YHV หรือ MAb against WSSV เจือจาง 1: 200 ใน 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือป้อนที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน ในกล่องเก็บความชื้น
- 3.4. ล้างด้วย 0.5% blotto จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 3.5. นำไปป้อนใน goat-anti mouse IgG-HRP antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1: 1500 ใน 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
- 3.6. ล้างด้วย 0.5% blotto จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
- 3.7. develop สี ด้วยสารละลายสับสเตรท (0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% H₂O₂ และ 0.05% CoCl₂ ใน PBS) เป็นเวลา 5 นาที สังเกตจุดสีดำในกรณีที่ติดเชื้อไวรัส

การเตรียมสารละลาย

1. 5% blotto

นมพว่องมันเนย	5	กรัม
1% Merthiolate	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วย PBS ให้ครบ	100	มิลลิลิตร

2. 1% Cobalt chloride

Cobalt chloride	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

บทปฏิบัติการที่ 4

Western blot analysis

ขั้นตอน

4.1 นำตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อสกัดมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ดังนี้

4.1.1 ประกอบชุดเตรียมเจลโดยประกอบกระจก electrophoresis (โดยปฏิบัติตามคู่มือการใช้งาน) โดยเตรียมส่วนผสมของสารละลายอะคริลาไมด์โดยให้ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในส่วนของ separating gel เท่ากับ 12 % (YHV) หรือ 15% (WSSV) โดยมีส่วนผสมตามตาราง เกล็ดในช่องว่างระหว่างกระจก ให้ความสูงของเจล 5 เซนติเมตร และเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อปรับให้น้ำเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ให้เจลแข็งตัว (จะสังเกตเห็นเส้นแบ่งชั้นระหว่างน้ำและเจล) จากนั้นเริ่มเตรียม stacking gel 4% เทน้ำน้ำเจลออกใส่ที่หีแบ่งช่องเจล แล้วเติม stacking gel ลงไป แล้วรอให้แข็งตัว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.1 ส่วนผสมของเจล

	Separating gel		Stacking gel
	12 % T 2.7 % C _{Bis}	15 % T 2.7 % C _{Bis}	4 % T 2.7 % C _{Bis}
30 % T 2.7 % C _{Bis} (1.1)	4.0 ml	5.0 ml	0.67 ml
1.5 M tris-Cl pH 8.8 (1.2)	2.5 ml	2.5 ml	-
0.5 M tris-Cl pH 6.8 (1.3)	-	-	1.25 ml
10 % SDS (1.4)	0.1 ml	0.1 ml	0.05 ml
Distilled water	3.35 ml	2.35 ml	3.05 ml
ผสมและใช้ vacuum pump ดึงอากาศออกจากสารละลาย			
10 % Ammonium persulfate (1.5)	50 μ l	50 μ l	25 μ l
TEMED	3.5 μ l	3.5 μ l	2.5 μ l
ผสมและเทอย่างรวดเร็วจนในช่องระหว่างกระจก			

4.1.2 นำตัวอย่างเลือดหรือเนื้อเยื่อสกัดมาผสมกับ 2X treatment buffer อัตราส่วน 1:1 แล้วต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 1 นาที

4.2.3 ประกอบชุด run gel เติม running tank buffer แล้วนำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาใส่ในช่องเจล ให้มีปริมาณโปรตีนช่องละประมาณ 10-15 ไมโครกรัม เปิดความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ ปลอຍให้ตัวอย่างเคลื่อนลงมาจนถึง separating gel จากนั้นปรับความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ แล้วให้ตัวอย่างเคลื่อนลงมาจนถึงขอบเจลด้านล่าง จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

4.2. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงในกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยเทคนิค Western blot

4.2.1 แกะเจลออกจากแผ่นกระจกในชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส วางเจลลงประกบกับกระดาษไนโตรเซลลูโลสที่มีขนาดเท่ากับแผ่นเจล นำประกอบในชุด Western blot เติม towbin transfer buffer เย็นจัดลงไป เติมน้ำแข็ง และเปิดความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.2.2 นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสออกจากชุด Western blot

4.2.3. แล้วนำไป block ใน 0.5% blotto เป็นเวลา 30 นาที

4.2.4. นำกระดาษไปบ่มใน MAb against YHV หรือ MAb against WSSV เจือจาง 1: 200 ใน 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

4.2.5 ล้างด้วย 0.5% blotto จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

4.2.6 นำไปบ่มใน goat-anti mouse IgG-HRP antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1: 1500 ใน 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

4.2.7 ล้างด้วย 0.5% blotto จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

4.2.8 develop สี ด้วยสารละลายสับสเตรท (0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน PBS) เป็นเวลา 5 นาที สังเกตแถบโปรตีนสีดำที่เป็นองค์ประกอบของไวรัส

การเตรียมสารละลาย

1. Stock solution :

1.1 Monomer solution (30 % T, 2.7 % C_{Bis})

Acrylamide (BIO-RAD)	58.4	กรัม
Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide, BIO-RAD)	1.6	กรัม

น้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น	200	มิลลิลิตร
เก็บในขวดสีชาที่ 4°C		

1.2 4 X Running gel buffer (1.5 M tris-Cl pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (BIO-RAD)	36.3	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	200	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1N HCl		

1.3 4 X Stacking gel buffer (0.5 M tris-Cl pH 6.8)

Tris	3	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	50	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1N HCl		

1.4 10 % SDS

SDS (sodium dodecyl sulfate, BIO-RAD)	50	กรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	500	มิลลิลิตร

1.5 10 % Ammonium persulfate (freshly prepared)

Ammonium persulfate (BIO-RAD)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

1.6 Running gel overlay (0.375 M tris-Cl pH 8.8, 0.1 % SDS)

1.5 M Tris (1.2)	25	มิลลิลิตร
10 % SDS (1.4)	1	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น	1	มิลลิลิตร

1.7 2 X Treatment buffer (0.125 M tris-Cl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 10 %

2-mercaptoethanol)

0.5 M Tris (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
10 % SDS (1.4)	4	มิลลิลิตร
Glycerol	2	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

2. Running buffer :

2.1 SDS-PAGE Tank buffer

(0.025 M tris pH 8.3, 0.192 M glycine, 0.1 % SDS)

Tris	12	กรัม
Glycine	57.6	กรัม
10% SDS (1.4)	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4,000	มิลลิลิตร

3. Towbin transfer buffer pH 8.8

3.1 25 mM tris, 192 mM glycine, 20 % methanol pH 8.8

Tris	3.03	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น ก่อนใช้บัฟเฟอร์ต้องแช่เย็นจัด	1,000	มิลลิลิตร

บทปฏิบัติการที่ 5

Strip test

อุปกรณ์

- แท่งพลาสติกสำหรับบดเนื้อเยื่อ
- เข็มฉีดยาสำหรับเจาะเลือด (syringe)
- สารเก็บตัวอย่าง
- ตลับทดสอบ (strip test)

ขั้นตอน

ตัวอย่างจากเนื้อเยื่อ

- 1) แบ่งสารเก็บตัวอย่างประมาณ 0.5 มล. ลงในหลอดที่เตรียมไว้
- 2) ใช้กรรไกรตัดส่วนของเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจ เช่น เหงือก, ส่วนปลายของขาว่ายน้ำ, เนื้อเยื่อใต้เปลือกส่วนหัวและลำตัว
- 3) ใช้ปากคีบ คีบเนื้อเยื่อลงในหลอดที่เตรียมไว้ บดเนื้อเยื่อในหลอดให้ละเอียดพอสมควร
- 4) ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสออกมาประมาณ 0.1 มล. (4-5 หยด) หยดลงในช่องวงรี (s) บนชุดทดสอบ
- 5) ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ (ไม่ควรอ่านผลหลังจากทิ้งไว้นานกว่า 30 นาที)

ตัวอย่างจากเลือด

- 1) ใช้เข็มฉีดยาดูดสารเก็บตัวอย่างในหลอดที่เตรียมไว้ประมาณ 0.2 มล.
- 2) ดูดเลือดจากแอ่งเลือดบริเวณใต้ท้องหรือหัวใจประมาณ 0.1 มล.
- 3) ผสมสารเก็บตัวอย่างและเลือดให้เข้ากัน โดยการดันก้านกระบอกฉีดยาขึ้น-ลงหรือดีดเบา ๆ
- 4) หยดเลือดที่ผสมสารเก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้วประมาณ 0.1-0.2 มล. ลงในช่องวงรี (s) บนชุดทดสอบ
- 5) ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาทีจึงอ่านผลการทดสอบ (ไม่ควรอ่านผลหลังจากทิ้งไว้นานกว่า 30 นาที)

การอ่านผล

โดยดูแถบสีชมพูที่ปรากฏขึ้นในช่องแสดงผลของชุดทดสอบ ถ้าพบว่าปรากฏแถบสีชมพู/ม่วง 2 แถบตรงกับตัวอักษร C (control) และ T (test) แสดงว่ากึ่งที่นำมาทำการทดสอบติดเชื้อ แต่ถ้าพบว่าปรากฏสีชมพู/ม่วง แถบเดียวตรงกับตัวอักษร C (control) แสดงว่ากึ่งที่นำมาทดสอบไม่ติดเชื้อหรือติดในระดับที่ต่ำกว่าความสามารถของแถบทดสอบที่จะตรวจจับได้

ข้อควรระวัง

- 1) อุปกรณ์ทุกชนิดที่นำมาใช้ควรเป็นอุปกรณ์ที่สะอาด ผ่านการฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C, ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาทีก่อนใช้ทุกครั้ง
- 2) ชุดตรวจภาคสนามนี้เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นเท่านั้น หลังจากการตรวจหากพบว่าได้ผลเป็นลบ ควรตรวจซ้ำด้วยวิธีการทาง PCR หรือตรวจดูความผิดปกติของเนื้อเยื่อ (histology) เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง



รายชื่อและที่อยู่คณะกรรมการ

1. ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

โทรศัพท์ (038) 745-900 ต่อ 3093

โทรสาร (038) 393-491 E-mail : praparsi@buu.ac.th

2. อ.ดร.พอจิต วิโนทพรรษ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

โทรศัพท์ (038) 745-900 ต่อ 3056

E-mail : phochit2002@yahoo.com

3. รศ.ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.ศรีนครินทรวิโรฒ กทม.

โทรศัพท์ 0-2664-1000 ต่อ 8515

โทรสาร 0-2260-0127 E-mail : paisarn@swu.ac.th

4. อ.ดร.ศิวพร ลงยันต์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.ศรีนครินทรวิโรฒ กทม.

โทรศัพท์ 0-2664-1000 ต่อ 8515

โทรสาร 0-2260-0127 E-mail : siwaporn@swu.ac.th



รายชื่อและที่อยู่ผู้รับการอบรมการตรวจไวรัสในกึ่งทะเลโดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดีแก่ผู้ประกอบการ

รายชื่อ	ตำแหน่ง	หน่วยงาน	เบอร์โทรศัพท์
1.นางจันทร์จรัส วัฒนะโชติ	นักวิทยาศาสตร์	สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา	038-391671, 01-7758219 janjarus @ bims.buu.ac.th
2.นางสาวบังอร ขำเพชรผล	นักวิทยาศาสตร์	คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสารสนเทศ จันทบุรี	039-310000 , 098955425 bangon @ buu.ac.th
3.นายบัลลังก์ เนืองแสง	อาจารย์	คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสารสนเทศ จันทบุรี	039-310000 , 09-4005625 bunlung @ buu.ac.th
4.นางสาวริษา ด้อยศักดิ์	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง	038-655301 , 01-7231803 nungair @ hotmail.com
5.นางสาวนิดา สุเมธลักษณ์	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง	038-655301 , 096869274
6.นางสมพิศ แยมเกษม	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง	09-7646781
7.นางกฤษฎณา จันทรแก้ว	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง	01-9295489
8.นางสาวเยาวภา อุทาวงศ์	นักวิทยาศาสตร์	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง	038-655301
9.นางสาวแสงเดือน นาคสุวรรณ	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรี	038-341166 , 01-7812449
10.นางศศิวิมล ปิติพรชัย	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรี	038-341166 , 01-7620308
11.นางธิดาพร จวีร์ภักดี	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี	039-457987-8 , 01-9826430 Chonfisheres @ yahoo.com

รายชื่อ	ตำแหน่ง	หน่วยงาน	เบอร์โทรศัพท์
12.นางวัชร สีสด	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งจันทบุรี	039-457987-8
13.นายธวัช สีนุกจันทร์	หัวหน้าแผนกแลป	บริษัทไทยฮอริสัน จำกัด	038-697011 , 01-8656458
14.ดร.ชัยวุฒิ สุตทองดง	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร	034-857136 , 01-3943217 chaiwud @ yahoo.com
15.นางสาวหทัยชนก สาทรัมย์ทอง	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ	บริษัท พี.ซี.อาร์ มหาลาก (9999) จำกัด	038-595613-5 , 01-9466040 TATA75 @ yahoo.com
16.นางสาวพิมพ์พา อินทราเวียง	กรรมการผู้จัดการ	บริษัท คลินิกสัตว์น้ำ (1999) จำกัด	038-821975-6 , 01-8012215
17.นายปราโมทย์ สังข์สุขศิริกุล	เจ้าของกิจการ	ปราโมทย์ฟาร์ม	038-398307 , 01-9441155 pramotefarm @ hotmail.com
18.นางสาวเสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง	นักศึกษานิเทศศาสตร์	คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	02-5792924 , 01-2644705 Konan_t23 @ yahoo.com
19.นางสาวนิตยา ยิ้มเจริญ	นักศึกษานิเทศศาสตร์	คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	02-5792924 , 01-5903384 ning.foo @ hotmail.com
20.นางสาววิมลสิริ อึ้งอร่ามถาวร	นักวิชาการ	ร้านแว่นตานิเทศศาสตร์	038-677601 , 01-4921133
21.นายสามารถ แสงอุดมพร	ผู้จัดการทั่วไป	บริษัทมหาชนจำกัด เจริญโภคภัณฑ์อาหาร	039-521884 , 06-3286878 samart.s @ cpf.co.th
22.นายศิริยศ แซ่มช้อย	ผู้จัดการแผนการตรวจ สอบสวนพันธุ์กรรม	บริษัทมหาชนจำกัด เจริญโภคภัณฑ์อาหาร	039-521884 , 01-8692616 SIRIYOT_CHAMCHOY @ yahoo.com
23.นางสาวบุศรินทร์ เลอเลิศภักดี	ผู้จัดการฝ่ายวิจัยและ ควบคุมคุณภาพลูกกุ้ง	บริษัทมหาชนจำกัด เจริญโภคภัณฑ์อาหาร	039-521884 , 01-2093229 budsarin.l @ cpf.co.th

รายชื่อ	ตำแหน่ง	หน่วยงาน	เบอร์โทรศัพท์
24.นายทรงวุฒิ เพ็ชรรัตน์	ผู้จัดการฟาร์ม เพาะฟักลูกกุ้ง	บริษัทมหาชนจำกัด เจริญโภคภัณฑ์อาหาร	039-521884 , 04-1540990 noochare @ yahoo.com
25.นายอมรเทพ โชติช่วง	เจ้าพนักงานประมง	สำนักงานประมงจังหวัดฉะเชิงเทรา	038-511852 , 01-17617613 amornt2003 @ yahoo.com
26.นางไพรัช เจียรรัตน์	เจ้าพนักงานประมง	สำนักงานประมงจังหวัดฉะเชิงเทรา	038-511852 , 06-3015786
27.นายประสิทธิ์ ภูหงษ์	เจ้าหน้าที่บริหารประมง	สำนักงานประมงจังหวัดฉะเชิงเทรา	038-511852 , 01-17121120
28.นายศักดิ์ชัย โชติคุณ	นักวิชาการประมง	สำนักงานประมงจังหวัดฉะเชิงเทรา	038-511852
29.นางสาวอุไร หนูเสียง	พนักงานห้องปฏิบัติการ	สวัสดิการการค้า ฟาร์มกุ้งพี	039-431445 , 01-9581731
30.นางสาวนุชระพี สิงห์คมสาร	พนักงานแล็บ	บริษัทมหาชนจำกัด เจริญโภคภัณฑ์อาหาร (ฟาร์มกะไย 1)	039-456099
31.นางสาวรัตติกาล ทับตา	พนักงานแล็บ	แอ็ดวานซ์ อควาควิลเจอร์	038-867429
32.นายสมประสงค์ นามจำปา	ผู้จัดการฟาร์ม	โครงการพัฒนาส่วนพระองค์ (ฟาร์มบ้านสร้าง)	01-5157568 somprasongnan @ yahoo.com
33.นายจรัญ วงษ์วิวัฒนาวุฒิ	นักวิชาการประมง	สถานีประมงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ฉะเชิงเทรา	038-531387 , 01-5757529
34.นาย วัลลพ ทิมดี	นักวิชาการประมง	สถานีประมงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ฉะเชิงเทรา	038-531387
35.นาย ยุทธนา จิตแหลม	นักวิชาการประมง	สถานีประมงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ฉะเชิงเทรา	038-531387
36.นาย ประสิทธิ์ กันหา	นักวิชาการประมง	สถานีประมงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ฉะเชิงเทรา	038-531387



ประวัติผู้วิจัย

Curriculum vitae

1. ชื่อ นายไพศาล สิทธิกรกุล

Mr. Paisarn Sithigorngul

2. รหัสประจำตัว 37400122

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โทรศัพท์ 0-2664-1000 ต่อ 8515

โทรสาร 0-2260-0127

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	สถาบัน	ประเทศ
2515	ตรี	กศ.บ.	ชีววิทยา	มศว	ไทย
2517	โท	วท.ม.	สัตววิทยา	ประสานมิตร จุฬาลงกรณ์- มหาวิทยาลัย	ไทย
2526	โท	M.A.	Cell Biology	U. of Kansas- Lawrence	U.S.A.
2530	เอก	Ph.D.	Zoology	U. of Wisconsin- Madison	U.S.A.

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ -Neurobiology และ Immunology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

7.1.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. Sithigorngul, P., P. Burton, T. Nishihata, and L. Caldwell. 1983. Effect of sodium salicylate on epithelial cells of rectal mucosa of the rat: A light and electron microscopic study. Life Sci. 33:1025-1032.
2. Sithigorngul, P., C. Cowden, J. Gaustella and A.O.W. Stretton. 1989. Generation of monoclonal antibodies against a nematode peptide extract: Another approach for identifying unknown neuropeptides. J. Comp. Neurol. 284:389-397.
3. Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. 1990. Neuropeptide diversity in *Ascaris*: An immunocytochemical study. J. Comp. Neurol. 294:362-376.

4. Sithigorngul, P., A.O.W. Stretton and C. Cowden. 1991. A versatile dot-ELISA method with femtomole sensitivity for detecting small peptides. *J. Immunol. Meth.* 141: 23-32.
5. Stretton, A.O.W., C. Cowden, P. Sithigorngul and R.E. Davis. 1991. Neuropeptides in the nematode *Ascaris suum*. *Parasitology*. 102:s107-s116.
6. Stretton, A.O.W., J. Donmoyer, R. Davis, J. Meads, C. cowden and P. Sithigorngul. 1992. Motor behavior and motor nervous system function in the nematode *Ascaris suum*. *J. Parasitology*. 78: 206-214.
7. Sithigorngul, W., S. Saengmongkolpipat, S. Reungmaneeplatoon and P. Sithigorngul. 1993. Immunocytochemical localization of neuropeptides in the eyestalk of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Proceedings of the Second Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology*. Chiangmai, Thailand. October 26-29. p. 74-75.
8. Cowden, C., P. Sithigorngul, P. Brackley, J. Guastella and A.O.W. Stretton 1993. Localization and differential expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the nematode, *Ascaris suum*. *J. Comp. Neurol.* 333: 455-468.
9. Johnson C.D., C.A. Reinitz, P. Sithigorngul and A.O.W. Stretton. 1996. Neuronal localization of serotonin in the nematode *Ascaris suum*. *J. Comp. Neurol.* 367 : 352-360.
10. Sithigorngul, P., C. Cowden and A.O.W. Stretton. 1996. Heterogeneity of cholecystokinin/gastrin-like immunoreactivity in the nervous system of the nematode *Ascaris suum*. *J. Comp. Neurol.* 370 : 427-442.
11. Sithigorngul, P., W. Saraithongkum, S. Jaideechoey, S. Longyant and W. Sithigorngul. 1998. Novel FMRFamide-like neuropeptides from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 120 : 587-595.
12. Longyant, S., P. Sithigorngul, N. Thammapalert, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 1999. Monoclonal antibody production specific to vitellin and vitellogenin of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Invert. Reprod. Dev.* 35(1) : 9-17.
13. Sithigorngul W., S. Jaideechoey, W. Saraithongkum, S. Longyant and P. Sithigorngul. 1999. Purification and characterization of an isoform of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Exp. Zool.* 284 : 217-224.

14. Sithigorngul, P., N. Panchan, T. Vilaivan, W. Sithigorngul and A. Petsom. 1999. Immunochemical analysis and immunocytochemical localization of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 124 : 73-80.
15. Longyant, S., P. Sithigorngul, N. Thammapalert, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 2000. Characterization of vitellin and vitellogenin of giant prawn *Penaeus monodon* using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. *Invert. Reprod. Dev.* 37(3) : 211-221.
16. Sithigorngul, P., P. Chauychuwong, W. Sithigorngul, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and P. Menasveta. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 42 : 27-34.
17. Sithigorngul, P., W. Saraithongkum, S. Longyant, N. Panchan, W. Sithigorngul and A. Petsom. 2001. Three more novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the eyestalk of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Peptides.* 22 : 191-197.
18. Sithigorngul, P., J. Pupuem, C. Krungkasem, S. Longyant, N. Panchan, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and A. Petsom. 2002. Seven novel FMRFamide-like neuropeptide sequences from the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 131: 325-337.
19. Sithigorngul, P., S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 49: 71-76.
20. Sithigorngul, P., N. Panchan, P. Chaivisuthangkura, S. Longyant, W. Sithigorngul and A. Petsom. 2002. Differential expression of CMG peptide and crustacean hyperglycemic hormone (CHHs) in the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptides.* 23 : 1943-1952.
21. Sithigorngul, P., J. Pupuem, C. Krungkasem, S. Longyant, N. Panchan, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and A. Petsom. 2002. Three novel PYFs : The members of NPY/PP superfamily from the eyestalk of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Peptides.* 23 : 1895-1906.

22. Soowanayan C., P. Sithigorngul and T.W. Flegel. 2002. Use of a specific monoclonal antibody to determine tissue tropism of yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by in situ immunocytochemistry. Proceeding of International Commemorative Symposium. Fisheries Science. 68 : 805-809.
23. Sithigorngul, P., J.C. Nanda and A.O.W. Stretton. 2003. A strategy for isolating rare peptides : Isolation and sequencing of a large peptide present in a single neuron of the nematode *Ascaris suum*. Peptides. 24 : 1025-1033.
24. Phansuwan-Pujito, P., S. Thammikul, P. Sithigorngul and P. Gooitrapong. 2003. Demonstration of amino acid neurotransmitter innervation in human pineal gland. Science Asia. 29 : 235-239.
25. Panchan, N., W.G. Bendena, P. Browser, P. Lungchukiat, S. S. Tobe, W. Sithigorngul, P. Chaivisuthangura, A. Rangsiruji, A. Petsom, T. Pewnim and P. Sithigorngul. 2003. Immuno-localization of allatostatin-like neuropeptides and their putative receptor in eyestalks of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. Peptides. 24 : 1563-1570.
26. Longyant, S., P. Sithigorngul, W. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, N. Thammapalerd and P. Menasveta. 2003. The effect of eyestalk extract on vitellogenin levels in the haemolymph of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. ScienceAsia. 29 : 371-381.
27. Soowanayan C., T.W. Flegel, P. Sithigorngul, J. Slater, A. Hyatt, S. Cramerri, T. Wise, M.St.J. Crane, J.A. Cowley, R.J.McCulloch and P.J. Walker. 2003. Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. Dis. Aquat. Org. 57 : 193-200.
28. Longyant, S., P. Sithigorngul, W. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, N. Thammapalerd and P. Menasveta. 2004. The effect of eyestalk homogenate on haemolymph vitellogenin levels in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Invert. Reprod. Dev. 45 (2) : 91-100.
29. Chaivisuthangkura P., J. Tangkhabuanbutra, S. Longyant, W. Sithigorngul, S. Rukpratanporn, P. Menasveta and P. Sithigorngul. 2004. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. ScienceAsia. 30 : 359-363.

30. Winotaphan, P., P. Sithigorngul, O. Muenpol, S. Longyant, S. Ruakpratanporn, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul, A. Petsom and P. Menasveta. 2005. Monoclonal antibodies specific to haemocytes of black tiger prawn *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology. 18 : 189-198.
31. Panchan N., P. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, S. Longyant, W. Sithigorngul and A. Petsom 2005. Production of monoclonal antibodies specific to eyestalk neuropeptides of *Penaeus monodon* using sinus gland section and immunosuppression technique. ScienceAsia. 31 : 29-35.
32. Phianphak W., S. Rengpipat, S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. 2005. Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. Dis. Aquat. Org. 63 (2-3) : 161-168.
33. Longyant, S., P. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, S. Rukpratanporn, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 2005. Differences in susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. Dis. Aquat. Org. 64(1) : 5-12.
34. Satidkanitkul, A., P. Sithigorngul, W. Sang-oum, S. Rukpratanporn, S. Sriurairatana, B. Withayachumnankul and T. Flegel. 2005. Synthetic peptide used to develop antibodies for detection of polyhedrin from monodon baculovirus (MBV). Dis. Aquat. Org. 65:79-84.
35. Rukpratanporn, S., W. Sukhumsirichart, P. Chaivisuthangkura, S. Longyant, W. Sithigorngul, P. Menasveta and P. Sithigorngul. 2005. Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 65:85-59.
36. Longyant, S., S. Sattaman, P. Chaivisuthangkura, S. Rukpratanporn, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. Experimental infection of yellow head virus (YHV) in some penaeid shrimps and crabs. Aquaculture. (in press)
37. Chaivisuthangkura, P., P. Phattanapaijitkul, N. Thammapalerd, S. Rukpratanporn, S. Longyant, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. Production of polyclonal antibody against recombinant VP26 structural protein of white spot syndrome virus (WSSV). (submitted).
38. Chaivisuthangkura, P., P. Phattanapaijitkul, N. Thammapalerd, S. Rukpratanporn, S. Longyant, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. Development of polyclonal antibody specific to VP19 envelope protein of white spot syndrome virus (WSSV) using recombinant protein. (submitted).

7.1.2 ผลงานวิจัยอื่น ๆ

1. สันติ เรืองมณีไพฑูรย์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล นงลักษณ์ สุกุลญาณนท์วิทยา นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และไพศาล สิทธิกรกุล 2532 พัฒนาการของรังไข่ในกุ้งก้ามกรามหลังจากวางไข่ วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5:100-105
2. วีระวรรณ สิทธิกรกุล สันติ เรืองมณีไพฑูรย์ นงลักษณ์ สุกุลญาณนท์วิทยา นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และไพศาล สิทธิกรกุล 2532 ผลของสารสกัดจากก้านตาของกุ้งก้ามกรามที่มีต่อการยับยั้งการพัฒนารังไข่ในกุ้งก้ามกราม วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5:106-114
3. Sithigorngul, W., P. Sithigorngul and P. Menasveta. 1992. Cross-reactivity of eyestalk extracts on gonad inhibition between *Macrobrachium rosenbergii* and *Penaeus monodon*. J. Sci. Res. Chula. Univ. 17:3-13
4. วีระวรรณ สิทธิกรกุล สันติ เรืองมณีไพฑูรย์ และไพศาล สิทธิกรกุล 2535 การตรวจสอบฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดของกุ้งก้ามกราม วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 8 (2):38-46
5. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล สันติ เรืองมณีไพฑูรย์ สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์ และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต 2537 การตรวจหานิวโรเปปไทด์ในก้านตาของกุ้งกุลาดำโดยปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน วารสาร 1(1):34-43
6. สุนิสา แสงมงคลพิพัฒน์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล และไพศาล สิทธิกรกุล 2537 การตรวจหาสารคล้ายพิกเมนต์ดีสเพอร์ซิงฮอร์โมนในก้านตาของกุ้งก้ามกรามด้วยวิธีอิมมูโนไฮโตเคมีสทรี วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 10(2):34-43
7. ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล นิรันดร์ บุญอิงเปรศพงศ์ และไพศาล สิทธิกรกุล 2537 การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลินและไวเทลโลเจนินในกุ้งตะกาด วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 10(2):10-26
8. ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล นิรันดร์ บุญอิงเปรศพงศ์ และไพศาล สิทธิกรกุล 2537 ระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกับพัฒนาการของรังไข่ของกุ้งตะกาด วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 10(2):27-39
9. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ศิวาพร ลงยันต์ และไพศาล สิทธิกรกุล 2538 สารคล้าย FMRFamide ในก้านตาของกุ้งก้ามกราม วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 11(1):15-28
10. วิมล สุขตั้งมั่น วีระวรรณ สิทธิกรกุล และไพศาล สิทธิกรกุล 2539 การผลิตแอนติบอดีต่อไวเทลลินในกุ้งก้ามกราม วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 12(2):25-37
11. วิมล สุขตั้งมั่น วีระวรรณ สิทธิกรกุล และไพศาล สิทธิกรกุล 2539 ผลของสารสกัดจากก้านตาต่อระดับไวเทลลินในเลือดของกุ้งก้ามกราม วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 12 (2):38-47

12. ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล นิรันดร์ บุญอิงเปรตพงศ์ และไพศาล สิทธิกรกุล 2539 ผลของสารสกัดจากก้านดาที่มีต่อระดับไวเทลโลเจนินในเลือดกึ่งตะกาด วาริช ศาสตร์ 3(1):1-13
13. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ศิวาพร ลงยันต์ นิรันดร์ บุญอิงเปรตพงศ์ และไพศาล สิทธิกรกุล 2539 ปฏิกริยาข้ามของสารสกัดจากก้านดากึ่งตะกาด กุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกรามต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับไวเทลโลเจนินในเลือดของกึ่งตะกาด วาริชศาสตร์ 3(1):14-20
14. สมปอง ใจดีเฉย วีระวรรณ สิทธิกรกุล นิรันดร์ บุญอิงเปรตพงศ์ และไพศาล สิทธิกรกุล 2540 การแยกฮอร์โมนที่เพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดจากก้านดาของกุ้งก้ามกราม วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 13(1):34-51.
15. วันเพ็ญ สาหร่ายทองคำ วีระวรรณ สิทธิกรกุล นิรันดร์ บุญอิงเปรตพงศ์ และไพศาล สิทธิกรกุล 2540 การแยกและทำให้บริสุทธิ์สารคล้าย FMRFamide จากก้านดาของกุ้งก้ามกราม วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 13(2):44-60.
16. ไพศาล สิทธิกรกุล พุทธิ ช่วยชูวงศ์ สมบัติ รักประทานพร ศิวาพร ลงยันต์ ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และวีระวรรณ สิทธิกรกุล 2543 การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 16(1):34-45.
17. สมบัติ รักประทานพร ไพศาล สิทธิกรกุล, พุทธิ ช่วยชูวงศ์ ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ศิวาพร ลงยันต์ และวีระวรรณ สิทธิกรกุล. 2543. การใช้ indirect immunoperoxidase technique รูปแบบต่างๆ ในการวินิจฉัยการติดเชื้อโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. การประชุมกึ่งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 2 “การยกระดับกุ้งไทยด้วยงานวิจัยและพัฒนา”. 14-22.
18. ไพศาล สิทธิกรกุล สมบัติ รักประทานพร ศิวาพร ลงยันต์ พุทธิ ช่วยชูวงศ์ ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร, วีระวรรณ สิทธิกรกุล และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต. 2543. โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ capsid protein ของไวรัสโรคหัวเหลือง. การประชุมกึ่งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 2 “การยกระดับกุ้งไทยด้วยงานวิจัยและพัฒนา”. 7-13.
19. ไพศาล สิทธิกรกุล ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ยัยนับ แวและ สมบัติ รักประทานพร ศิวาพร ลงยันต์ และ วีระวรรณ สิทธิกรกุล. 2543. พาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Atyidae และ Palaemonidae. การประชุมกึ่งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 2 “การยกระดับกุ้งไทยด้วยงานวิจัยและพัฒนา”. 23 –31.
20. ดวงใจ งามสม นุชนาถ เกษมวงศ์ อรวรรณ สัตยาลัย วีระวรรณ สิทธิกรกุล และ ไพศาล สิทธิกรกุล 2544 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลลีนและไวเทลโลเจนิน ของปูทะเล วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 17(2):87-101.
21. ศิวาพร ลงยันต์ สมบัติ รักประทานพร จรัสพร ตั้งขบวนบุตร ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และไพศาล สิทธิกรกุล 2544 ความทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกึ่งตะกาดโอคักและกึ่งตะกาดหัวมัน วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 17(2):120-129.

22. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ไพศาล สิทธิกรกุล สุดา ชูถิ่น สมบัติ รักประทานพร จรัสพร ตั้งขบวนบุตร ศิวาพร ลงยันต์ วีระวรรณ สิทธิกรกุล และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต 2545 ความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 4. "เทคโนโลยีเพื่อกุ้งไทย...กุ้งคุณภาพระดับโลก". 138-149.
23. ศิวาพร ลงยันต์ ไพศาล สิทธิกรกุล สมบัติ รักประทานพร จรัสพร ตั้งขบวนบุตร ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต 2545 ความทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งตะกาดไคคและกุ้งตะกาดหัวมัน การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 4. "เทคโนโลยีเพื่อกุ้งไทย...กุ้งคุณภาพระดับโลก". 150-160.
24. สมบัติ รักประทานพร วาสนา สุขุมศิริชาติ ศิวาพร ลงยันต์ ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร วีระวรรณ สิทธิกรกุล ไพศาล สิทธิกรกุล และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต 2547 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ hepatopancreatic parvovirus ของกุ้งกุลาดำ การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 5 คุณภาพกุ้งไทย มาตรฐานความปลอดภัยระดับโลก 29-30 มีนาคม 2547 โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชัน กรุงเทพฯ ฯ หน้า 281-288.
25. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร จรัสพร ตั้งขบวนบุตร ศิวาพร ลงยันต์ สมบัติ รักประทานพร ภิรมศักดิ์ พัฒน์ไพจิตรกุล วีระวรรณ สิทธิกรกุล และไพศาล สิทธิกรกุล 2547 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ rVP28F118 เพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 5 คุณภาพกุ้งไทย มาตรฐานความปลอดภัยระดับโลก 29-30 มีนาคม 2547 โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชัน กรุงเทพฯ ฯ หน้า 289-300.
26. ศิวาพร ลงยันต์ สมบัติ รักประทานพร วีระวรรณ สิทธิกรกุล ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ไพศาล สิทธิกรกุล และเปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต 2547 การพัฒนาชุดตรวจไวรัสโรคหัวเหลืองชนิดสะดวกใช้ : strip test การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 5 คุณภาพกุ้งไทย มาตรฐานความปลอดภัยระดับโลก 29-30 มีนาคม 2547 โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชัน กรุงเทพฯ ฯ หน้า 301-311.
27. สุนิรัตน์ ศรีธามัน สมบัติ รักประทานพร ศิวาพร ลงยันต์ ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร วีระวรรณ สิทธิกรกุล และไพศาล สิทธิกรกุล 2547 ความต้านทานการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในปูชนิดต่าง ๆ การประชุมวิชาการกุ้งทะเลแห่งชาติ ครั้งที่ 5 คุณภาพกุ้งไทย มาตรฐานความปลอดภัยระดับโลก 29-30 มีนาคม 2547 โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชัน กรุงเทพฯ ฯ หน้า 312-324.

7.2 งานวิจัยที่อยู่ระหว่างดำเนินการ

1. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อการพัฒนาชุดตรวจสำหรับไวรัสและแบคทีเรียในกุ้งและสัตว์น้ำ (BIOTEC, หัวหน้าโครงการ)

2. การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อเพื่อการผลิตเชิงพาณิชย์
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio vulnificus* *V. parahaemolyticus* (ฝ่ายวิจัย มศว, หัวหน้าโครงการ)
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio harveyi*
(สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, ผู้ร่วมโครงการ)
4. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อพัฒนาชุดตรวจ Taura syndrome virus (BIOTEC, ผู้ร่วมโครงการ)
5. การพัฒนาชุดตรวจไวรัสโรคตัวแดงดวงขาว (WSSV) ชนิด sandwich ELISA แบบกลับและชนิดแถบสี (BIOTEC, ผู้ร่วมโครงการ)

