

การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae
โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี

ปริญญานิพนธ์
ของ
ยัยนั๊บ แวและ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
มีนาคม 2545
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

545.3847

545.3847

703

การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae
โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี

บทคัดย่อ
ของ
ยัยนั บ แวและ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา
มีนาคม 2545

๕ ๕๕๕๕

30 MAR 2545

ยัยนับ แวและ. (2545). การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ *Palaemonidae* *Penaeidae* และ *Atyidae* โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี. ปรินซ์นิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล, รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล, อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์.

จากการสำรวจตัวอย่างกุ้งวงศ์ *Palaemonidae* ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* จากป่าชายเลน อำเภอมืองจังหวัดชลบุรี กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กุ้งวงศ์ *Penaeidae* ได้แก่ กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* กุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* และกุ้งวงศ์ *Atyidae* ได้แก่ กุ้งกะปิ *Caridina* sp. จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตน้ำกร่อย อำเภอพระสมุทรเจดีย์ และเขตน้ำจืด อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ และนำมาตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ และทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง หรือด้วยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน จากการตรวจด้วยวิธี immunocytochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ๆ (135, 67 และ 22 กิโลดาลตัน) ของไวรัสหัวเหลืองคือ V3-2B, Y18-2D และ Y19 ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากกุ้งที่ได้จากธรรมชาติทั้ง 3 วงศ์ สำหรับกุ้งในวงศ์ *Penaeidae* คือ *Metapenaeus affinis* (4/10) เท่านั้น พบว่ามีการติดเชื้อไวรัสหลังจากการให้เชื้อไวรัสโดยการกิน ส่วนใหญ่มีการติดเชื้อรุนแรงเมื่อได้รับเชื้อโดยการฉีด ส่วนกุ้งในวงศ์ *Palaemonidae* ทุกชนิด ไม่มีการติดเชื้อโดยการกิน แต่การให้เชื้อโดยการฉีด พบว่า *M. rosenbergii* (1/21) และ *M. lanchesteri* (4/22) ส่วนน้อยที่แสดงการติดเชื้อ แต่ *M. sintangense* (8/12) และ *P. styliferus* (9/10) ส่วนใหญ่จะมีการติดเชื้อแต่ไม่รุนแรง ขณะที่ *P. serrifer* และ *Caridina* sp. ไม่พบการติดเชื้อเมื่อได้รับเชื้อโดยการกิน และเนื่องจากมีขนาดเล็ก จึงไม่สามารถทดลองการติดเชื้อไวรัส จากการทดลองครั้งนี้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 135 กิโลดาลตันแสดงการติดสีปริมาณน้อย แตกต่างชัดเจนจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 67 และ 22 กิโลดาลตัน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับความสามารถในการทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกลุ่มนี้บางชนิด

IMMUNOCYTOCHEMICAL DETECTION OF YELLOW HEAD VIRUS IN
PALAEMONID, PENAEID AND ATYID SHRIMPS

AN ABSTRACT
BY
YAINUB WAELEH

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Biology
at Srinakharinwirot University
March 2002

Yainub Waelaeh. (2002). *Immunocytochemical detection of yellow head virus in Palaemonid, Penaeid and Atyid shrimps*. Master thesis, M. Ed. (Biology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Dr. Weerawan Sithigorngul, Assoc. Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul, Dr. Siwaporn Longyant.

Immunocytochemical method utilizing monoclonal antibodies (V3-2B, Y18-2D and Y19) specific to 135, 67, and 22 kDa proteins of yellow head virus (YHV) was used to detect natural and experimental infection of YHV in Atyid shrimp; *Caridina* sp., Palaemonid shrimps; *Palaemon styliferus*, *P. serrifer*, *Macrobrachium sintangense*, *M. lanchesteri*, *M. rosenbergii*, and penaeid shrimps; *Metapenaeus affinis* and *M. brevicornis* collected from freshwater and brackish water nearby *Penaeus monodon* farming area in Smutprakarn and Choburi provinces. No YHV immunoreactivity was observed in all species of natural collected shrimps. In experimentally infected shrimps fed with muscle tissue of YHV-infected *P. monodon* for three days, no sign of infection was found in all species of Atyid shrimp and Palaemonid shrimp and a Penaeid shrimp *M. brevicornis*. However, mild infection was observed in *M. affinis* with low proportion (4/10). After three days of injection with YHV, all penaeid shrimps in both Penaeid species, *M. affinis* (11/11) and *M. brevicornis* (10/10), were heavily infected whereas two Palaemonid shrimp; *P. styliferus* (9/10) and *M. sintangense* (8/12) demonstrated mild infection with high proportion. In contrast mild infections were observed in *M. rosenbergii* (1/21) and *M. lanchesteri* (4/22) with low proportion. The YHV injection experiment could not be performed in *P. serrifer* and *Caridina* sp. due to the size limitation. In most cases, the immunoreactivities demonstrated by MAb against 135 kDa proteins were not as distinctive as those demonstrated by MAbs against 67 and 22 kDa proteins. This result suggests the possibility of YHV resistance in some of these species.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae

โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี

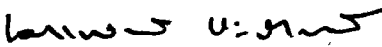
ของ

นางสาวยัยนั บ แวและ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกชีววิทยา

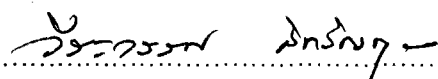
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....  คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

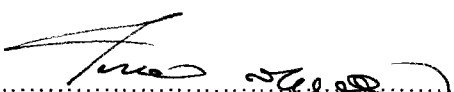
(รองศาสตราจารย์ ดร. นภาพร หะวานนท์)

วันที่ เดือน พ.ศ. 2545

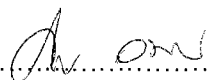
คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....  ประธาน

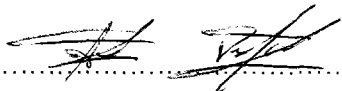
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

.....  กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)

.....  กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

.....  กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(อาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

.....  กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(อาจารย์ ดร. วาสนา สุขุมศิริชาติ)

ประกาศขอบคุณการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดีจาก
รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และ
อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร และอาจารย์ ดร. วาสนา สุขุมศิริชาติ
ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. อนันต์ พุทธิพิทยาสถาพร ที่ให้คำแนะนำในการบันทึกภาพเพื่อ
ใช้ในการประกอบปริญญานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณผู้อำนวยการไพรัช แสงทอง และผู้อำนวยการจิต บุญราษฎร์ ที่ให้โอกาสใน
การลาศึกษาต่อในครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์เวยาวรหัตตะ สะนุง และอาจารย์ประดิษฐ์ ลัดเลีย ที่เป็นกำลังใจ
อย่างดียิ่งในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสุรีย์ วิเศษสมบัติ และคุณสมบัติ รักประทานพร ที่ให้คำแนะนำ
ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจด้วยดีมาโดยตลอดในระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพอจิต วิโนทพรรษ์ คุณสุดา ชูถิ่น คุณนนทิกา ปานจันทร์ ที่ช่วยเหลือ
ให้คำแนะนำในการทำวิจัย

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา (ผู้ล่วงลับ) มารดา คุณฮามีตะ แวและ และน้องสาว ที่
สนับสนุนในด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด จนทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้
สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี และขอขอบคุณผู้มีพระคุณที่ให้การช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทุกท่านที่มีได้
กล่าวนามในที่นี้ด้วย

ยัยนับ แวและ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	5
สมมติฐานของการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โรคห้วเหลือง.....	7
สัณฐานวิทยาของไวรัสห้วเหลือง.....	7
ชนิดของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae.....	8
เปรียบเทียบลักษณะของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae.....	8
กุ้งในวงศ์ Palaemonidae.....	9
กุ้งในวงศ์ Penaeidae.....	19
กุ้งในวงศ์ Atyidae.....	24
การศึกษาและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไวรัสห้วเหลือง.....	25
การศึกษาที่เกี่ยวกับพาหะของโรคไวรัสห้วเหลือง.....	33
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	39
สัตว์ทดลอง.....	39

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
3	อุปกรณ์และสารเคมี.....	39
	วิธีดำเนินการทดลอง.....	41
	การเก็บตัวอย่างกุ้ง.....	41
	การพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้ง.....	41
	การทดลอง.....	41
	การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology.....	42
	กระบวนการย้อมโดยวิธีอินไดเรคติมมูโนเปอร์ออกซิเดส.....	43
	การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	47
4	ผลการวิจัย.....	50
	การพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้ง.....	50
	การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี Immunocytochemistry	57
	การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการสำรวจกุ้งตาม	
	ธรรมชาติ.....	57
	การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำ	
	ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	57
	การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	59
5	สรุปและอภิปรายผล.....	111

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	118
ภาคผนวก.....	123
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	126

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในแต่ละอวัยวะบริเวณส่วนหัวของกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่สำรวจตามธรรมชาติ.....	61
2 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในแต่ละอวัยวะบริเวณส่วนหัวของกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน.....	62
3 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในแต่ละอวัยวะบริเวณส่วนหัวของกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน.....	63
4 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ใน กุ้งชนิดต่าง ๆ.....	116
5 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อตัวอ่อนชั้นต่าง ๆ ของกุ้งวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae.....	115

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology	48
2 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อไวรัสห้วเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งโดยวิธีอินไดเรค อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส.....	49
3 แสดงการหยด first antibody ในการตรวจหาเชื้อไวรัสห้วเหลือง.....	45
4 ลักษณะของกุ้งกะเปาะ <i>Palaemon styliferus</i>	53
5 ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำเค็ม <i>Palaemon serrifer</i>	53
6 ลักษณะของกุ้งกะต๋อม <i>Macrobrachium sintangense</i>	54
7 ลักษณะของกุ้งฝอย <i>Macrobrachium lanchesteri</i>	54
8 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	55
9 ลักษณะของกุ้งตะกาด <i>Metapenaeus affinis</i>	55
10 ลักษณะของกุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง <i>Metapenaeus brevicornis</i>	56
11 ลักษณะของกุ้งกะปิ <i>Caridina sp.</i>	56
12 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ หัวใจกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส ห้วเหลือง.....	64
13 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ อวัยวะน้ำเหลืองกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติด เชื้อไวรัสห้วเหลือง.....	65
14 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ กล้ามเนื้อกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ ไวรัสห้วเหลือง.....	66
15 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองของเนื้อเยื่อ บริเวณเหงือกกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ ไวรัสห้วเหลือง.....	67

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
16 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ตับและตับอ่อนกึ่ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ ไวรัสหัวเหลือง.....	68
17 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ รังไข่กึ่ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส หัวเหลือง.....	69
18 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ อวัยวะกึ่ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส หัวเหลือง.....	70
19 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ เยื่อผิวหนังได้เปลือกกึ่ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติด เชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	71
20 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ หัวใจกึ่ง <i>Palaemon styliferus</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	72
21 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ กล้ามเนื้อกึ่ง <i>Palaemon styliferus</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	73
22 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ เหงือกกึ่ง <i>Palaemon styliferus</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	74
23 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ตับและตับอ่อนกึ่ง <i>Palaemon styliferus</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	75
24 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ รังไข่กึ่ง <i>Palaemon styliferus</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	76
25 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือกกึ่ง <i>Palaemon styliferus</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	77

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
26 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณเนื้อเยื่อ สร้างเม็ดเลือดกึ่ง <i>Palaemon styliferus</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	78
27 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ หัวใจกึ่ง <i>Macrobrachium sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	79
28 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ กล้ามเนื้อกึ่ง <i>Macrobrachium sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.	80
29 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ตับและตับอ่อนกึ่ง <i>Macrobrachium sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	81
30 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ อวัยวะกึ่ง <i>Macrobrachium sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	82
31 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือกกึ่ง <i>Macrobrachium sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัส หัวเหลือง.....	83
32 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ บริเวณหัวใจกึ่ง <i>Macrobrachium lanchesteri</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	84
33 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ กล้ามเนื้อกึ่ง <i>Macrobrachium lanchesteri</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	85
34 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ เหงือกกึ่ง <i>Macrobrachium lanchesteri</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	86
35 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ตับและตับอ่อนกึ่ง <i>Macrobrachium lanchesteri</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	87
36 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ รังไข่กึ่ง <i>Macrobrachium lanchesteri</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	88

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
37 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณเนื้อเยื่อ บุผิวใต้เปลือกกุ้ง <i>Macrobrachium lancesteri</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	89
38 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ หัวใจกุ้ง <i>Macrobrachium rosenbergii</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	90
39 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ กล้ามเนื้อกุ้ง <i>Macrobrachium rosenbergii</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง....	91
40 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ตับและตับอ่อนกุ้ง <i>Macrobrachium rosenbergii</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	92
41 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ antennal gland กุ้ง <i>Macrobrachium rosenbergii</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	93
42 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ หัวใจกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	94
43 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ อวัยวะน้ำเหลืองกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	95
44 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ กล้ามเนื้อกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	96
45 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ เหงือกกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	97
46 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ตับและตับอ่อนกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	98
47 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ รังไข่กุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	99
48 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือกกุ้ง <i>Metapenaeus affinis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	100

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
49 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ หัวใจกึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	101
50 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ปมประสาทกึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	102
51 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ อวัยวะน้ำเหลืองกึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	103
52 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ กล้ามเนื้อกึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	104
53 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ เหงือกกึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	105
54 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ตับและตับอ่อนกึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง..	106
55 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ รังไข่กึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	107
56 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ อวัยวะกึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	108
57 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ Antennal gland กึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง	109
58 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณเนื้อเยื่อ บุผิวใต้เปลือกกึ่ง <i>Metapenaeus brevicornis</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง....	110

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

- 59 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของกุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 กำลังขยาย 200 เท่า (1 = กล้ามเนื้อ 2 = เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดของกุ้ง *Palaemon styliferus* 3 = หัวใจของกุ้ง *Macrobrachium sintangense* 4 = เนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือกของกุ้ง *Macrobrachium lanchesteri* 5 = Antennal gland ของกุ้ง *Macrobrachium rosenbergii* 6 = หัวใจ 7 = เหงือก 8 = รังไข่ของกุ้ง *Metapenaeus affinis* 9 = ปมประสาท 10 = อวัยวะน้ำเหลือง 11 = ตับและตับอ่อน 12 = อวัยวะของกุ้ง *Metapenaeus brevicornis*)..... 116

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กุ้งกุลาดำ (Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*) เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถส่งออกและทำรายได้ให้แก่ประเทศหลายหมื่นล้านบาท เนื่องจากเนื้อกุ้งมีรสชาติดี สามารถใช้ประกอบอาหารได้หลายชนิด โดยส่งออกในลักษณะของกุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง กุ้งกระป๋อง และแปรรูปกุ้งต้มสุกแช่เย็น ในปี 2541 ประเทศไทยผลิตกุ้งกุลาดำได้ถึง 240,000 เมตริกตัน ปี 2542 ผลิตกุ้งกุลาดำได้ทั้งหมดประมาณ 230,000 เมตริกตัน และปี 2543 ผลิตกุ้งกุลาดำได้ประมาณ 280,000 เมตริกตัน (ชลอ ลีมสุวรรณ. 2543 ; ทรงศักดิ์ ศรีบุญจิตต์. 2544)

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อเป็นการค้าในประเทศไทยกำลังเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมาก อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ขยายตัวเพิ่มขึ้นในช่วง 2 – 3 ปีที่ผ่านมา จนกระทั่งสามารถเป็นประเทศผู้นำในการผลิตกุ้งกุลาดำของโลก (ชลอ ลีมสุวรรณ. 2543) ปัจจุบันมีผู้ประกอบการในธุรกิจที่เกี่ยวข้องกับกุ้งกุลาดำในประเทศมากกว่า 200,000 คน ทำให้เกิดการกระจายรายได้ไปสู่เกษตรกรในภูมิภาค ถึงแม้ว่าอุตสาหกรรมนี้จะพัฒนาเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่ความสำเร็จในด้านการผลิตก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ มลพิษของสิ่งแวดล้อม การจัดการฟาร์ม การตลาด และโดยเฉพาะโรคกุ้ง (Flegel et al. 1995b) กุ้งกุลาดำได้รับเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียและไวรัส ซึ่งการได้รับเชื้อจุลินทรีย์นั้นอาจเกิดจากการได้รับเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือทั้งสองชนิดร่วมกัน หรือหลาย ๆ ชนิดร่วมกันก็ได้ จุลินทรีย์เหล่านี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายกับอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งมากที่สุด (Flegel. 1997)

ในจำนวนโรคกุ้งที่ตรวจพบนั้น โรคหัวเหลือง (yellow head disease) ก่อให้เกิดผลเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย (Flegel. 1997 ; Flegel, Boonyaratpalin and Withyachumnarnkul. 1997) เนื่องจากการแพร่ระบาดของโรค มีรายงานการระบาดของโรคหัวเหลืองครั้งแรกจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงต้นปี 2535 หลังจากนั้นในราวปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม โรคนี้ได้แพร่

ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณรอบทะเลสาบสงขลาและแพร่เข้าสู่จังหวัดปัตตานีในราวกลางเดือนมิถุนายน (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)

โรคหัวเหลืองเกิดจากการได้รับเชื้อไวรัสที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shaped or bacilliform morphology) มีขนาดความยาวประมาณ 190 – 220 นาโนเมตร และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50 – 60 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็น RNA และมี envelope ต่อมาได้มีการเรียกชื่อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองว่า ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus, YHV) กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลืองจะมีลักษณะอาการดังนี้คือ จะเห็นกุ้งมาเกยอยู่บริเวณขอบบ่อ การกินอาหารจะลดลงจนผิดปกติ กุ้งมีอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรงติด ลำตัวซีด ส่วนหัวซึ่งเป็นส่วนตับ ตับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลือง ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในวันที่สองหลังจากที่เริ่มเห็นอาการของโรค กุ้งจะตายเพิ่มขึ้นประมาณ 50% และ 70% ในวันที่สาม กุ้งจะตายหมดหรือเกือบหมดในวันที่สี่และห้า หลังจากเริ่มมีอาการให้เห็น (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535) เมื่อตรวจวิเคราะห์กุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ เช่น บริเวณเหงือกในกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง เซลล์ภายในเหงือก (pillar cell) จะบวม เกิดการตายและสลายตัวของเซลล์และออร์กาเนลล์ในส่วนนี้ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดระหว่าง pillar cell มากขึ้น มีการขยายตัวของท่อเลือด (lacuna) ใหญ่กว่าปกติ อวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ) ของกุ้งที่เป็นโรคจะเกิดการตายและเสื่อมสลายของเซลล์ รวมทั้งมีลักษณะของ granuloma เพิ่มมาก มีการคั่งของ hemolymph และการขยายตัวในส่วนของ hemal sinus นอกจากนั้นพบว่ามีการบวมพองของนิวเคลียสในเซลล์ของอวัยวะน้ำเหลืองทั่วไป ตรวจพบ dense bodies ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับอ่อน เหงือก และอวัยวะน้ำเหลือง เมื่อนำมาย้อมด้วย Feulgen reaction พบว่า dense bodies จะติดสีชมพูเข้มอยู่ภายใน cytoplasm (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535 ; Chantanachookin et al. 1993)

นอกจากจะพบโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำแล้ว ยังพบการติดเชื้อโรคนี้นอกกุ้งอีกหลายชนิดในประเทศต่าง 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)

ปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีหรือยาใด ๆ รักษาโรคหัวเหลืองได้ ดังนั้นวิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่นักวิชาการหลายกลุ่มทำการศึกษาเพื่อเสนอแนะ วิธีการป้องกันที่ดีที่สุดแก่

ผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ การจัดการที่ดีทั้งในเรื่องอาหาร น้ำ และพื้นบ่อ จะลดโอกาสการเกิดโรคได้มาก หลักเลี้ยงการใช้อาหารสดในการเลี้ยงกุ้ง รักษาสภาพพื้นบ่อให้สะอาด รวมทั้งไม่ใช้อุปกรณ์ระหว่างบ่อเลี้ยงปนกัน การเพาะเลี้ยงระบบปิดและการตรวจคุณภาพน้ำ (ชลอ ลิมสุวรรณ. 2543 ; Flegel et al. 1993) นอกจากนั้นการกำจัดสัตว์ต่าง ๆ เช่น กุ้ง ปู และอาร์โทรพอด (arthropod) ที่เชื่อว่าเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลืองก่อนปล่อยลูกกุ้งลงบ่อเลี้ยง ก็จะเป็นการป้องกันการระบาดของไวรัสหัวเหลืองได้ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์เหล่านี้เข้ามาสู่ระบบการเลี้ยงกุ้ง อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันเหล่านี้ก็ไม่ใช่วิธีการที่ดีที่สุด เนื่องจากลูกกุ้งที่นำมาเลี้ยงอาจได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองมาจากพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีเชื้ออยู่ก่อนแล้ว

การป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคหัวเหลือง ในปัจจุบันทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และลูกกุ้งวัยอ่อน ก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์ม โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการตรวจจับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งวิธีการนี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้ได้จำนวนมาก ทำให้ผู้ตรวจวินิจฉัยสามารถตรวจเชื้อไวรัสนี้ได้แม้จะมีปริมาณน้อย วิธีการนี้จะช่วยลดเวลาในการตรวจได้รวดเร็ว มีความไวสูง (Wongteerasupaya et al. 1997) ถึงแม้ว่า RT-PCR จะเป็นเทคนิคที่ปัจจุบันได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แต่มีข้อจำกัดคือต้องการอุปกรณ์พิเศษ และบุคลากรที่มีความรู้และความชำนาญทางเทคนิค RT-PCR เป็นอย่างดี นอกจากนี้ราคาในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างค่อนข้างสูงอีกด้วย รวมทั้งไม่สามารถรองรับความแม่นยำตลอดการนำผลมาเทียบเคียงกันระหว่างห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากแต่ละห้องปฏิบัติการใช้วิธีการที่แตกต่างกัน และวิธีการสุ่มตัวอย่างที่จะนำมาตรวจวินิจฉัยก็แตกต่างกันไปด้วย หากมีผลการตรวจที่ขัดแย้งกัน อาจทำให้เกิดความสับสนขึ้นกับผู้ให้บริการได้ และส่งผลให้ผู้ให้บริการเกิดความไม่มั่นใจในการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีการนี้ และด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้เทคนิค RT-PCR มีข้อจำกัดในด้านการใช้

Sithigorngul et al. (2000) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำเป็นผลสำเร็จ ทำให้สามารถใช้แอนติบอดีนี้ตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี immunocytochemistry ได้อย่างสะดวก และเสียค่าใช้จ่ายน้อยมาก ดังนั้นสามารถศึกษาการติดเชื้อในสัตว์ที่คาดว่าอาจเป็นพาหะได้อย่างกว้างขวาง

การศึกษาครั้งนี้จึงเริ่มศึกษาในกุ้งชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae ซึ่งสามารถพบกุ้งชนิดต่าง ๆ ทั้ง 3 วงศ์นี้ ปะปนอยู่จำนวนมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อสำรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติของกุ้งชนิดต่าง ๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ การติดเชื้อจากการทดลองด้วยวิธีการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และการติดเชื้อจากการทดลองด้วยวิธีการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้งที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสหัวเหลือง
2. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการและวางแผนแนวทางการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสหัวเหลืองต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. สำรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติของกุ้งชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae ในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอพระสมุทรเจดีย์ อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ อำเภอเมือง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จำนวนกุ้งแต่ละชนิดประมาณ 10 – 30 ตัว
2. ทดลองการติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae จำนวนกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองประมาณ 10 – 27 ตัว
3. ทดลองการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Palaemonidae และ Penaeidae จำนวนกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองประมาณ 10 ตัว
4. ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ การติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae โดยวิธี immunocytochemistry

นิยามศัพท์เฉพาะ

ศัพท์ที่ 1 Yellow head virus (YHV)

หมายถึง ไวรัสหัวเหลือง มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (bacilliform) ขนาด 50 – 60 x 190 – 200 nm ภายในเป็น nucleocapsid ล้อมรอบด้วย envelope ที่เป็นปุ่มปมหรือหนาม มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 170 135 67 และ 22 kDa ตามลำดับ

ศัพท์ที่ 2 Indirect peroxidase immunocytochemistry

หมายถึง เทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน (antigen) ในเนื้อเยื่อโดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อกัน เทคนิคนี้จะใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยสารบางชนิด เช่น เอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase มาติดกับแอนติบอดีตัวที่สอง จากนั้นตรวจสอบการมีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรทคือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารที่ทำให้เกิดสี (chromogen) คือ 3,3' – diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase กลายเป็นผลิตภัณฑ์ (product) คือออกซิเจนและน้ำ ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB ทำให้เกิดการตกตะกอนสีน้ำตาลในตำแหน่งที่มีเอนไซม์อยู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งที่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจหา คือ เชื้อไวรัสหัวเหลือง

สมมติฐานของการวิจัย

กุ้งในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae ที่อาศัยอยู่ในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำอาจจะมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและมีศักยภาพในการเป็นพาหะเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคติดเชื้อเป็นปัญหาที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพราะเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่เป็นสินค้าออกที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งมีสาเหตุต่าง ๆ ทั้งจากตัวเชื้อโรคเอง หรือเกิดจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น คุณภาพน้ำ อากาศ ดิน เป็นต้น ตลอดจนอาจเกิดจากผู้ประกอบการเองมีการจัดการที่ไม่ถูกต้อง สิ่งเหล่านี้ส่งผลกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หลายหน่วยงานได้พยายามหาแนวทางในการควบคุมโรค ซึ่งประสบความสำเร็จเพียงระดับหนึ่งเท่านั้น แต่ถ้าสามารถควบคุมโรคได้ทั้งหมดจะช่วยให้ต้นทุนการผลิตกุ้งกุลาดำลดต่ำลงกว่านี้อีกมาก จะส่งผลให้ประเทศไทยเป็นผู้นำการผลิตกุ้งกุลาดำของโลกต่อไป สำหรับไวรัสที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ได้แก่ monodon baculovirus (MBV) hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) เชื้อไวรัสแต่ละชนิดเมื่อมาสู่กุ้งแล้วจะอาศัยและทำอันตรายต่ออวัยวะของกุ้ง ก่อให้เกิดความรุนแรงต่าง ๆ กัน เช่น MBV จะพบที่ตับและตับอ่อนของกุ้ง จะทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมากต่อกุ้งในระยะโพสท์ลาร์วา (post larva) MBV มีผลทำให้กุ้งที่ติดเชื้อเจริญเติบโตช้า HPV จะพบเฉพาะบริเวณตับและตับอ่อน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนอย่างชัดเจน เป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าปกติ (ชโล ลิมสุวรรณ. 2543) HPV ทำให้เกิดโรคกุ้งแคระ ซึ่งชาวบ้านมักเรียกว่า “กุ้งจึกโก” ส่วนไวรัสตัวแดงดวงขาว จะพบได้ในเซลล์บุผิวชั้นนอกสุด (epithelial cell) โดยเฉพาะชั้นใต้เปลือกและบริเวณทางเดินอาหารทำให้กุ้งมีดวงขาวที่เปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว นอกจากนี้ทำให้ตัวกุ้งมีสีแดงหรือแดงอมส้ม (Kasornchandra et al. 2000) ไวรัสหัวเหลืองพบการติดเชื้อได้ที่บริเวณเหงือก อวัยวะน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือดและเม็ดเลือด ส่งผลให้เกิดการตายอย่างเฉียบพลันและรุนแรง เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้ว MBV และ HPV อาจไม่รุนแรงเท่า เพราะไม่ทำให้กุ้งตาย แต่ก่อให้เกิดความสูญเสียแก่ผู้เลี้ยงอย่างมากเช่นกัน เนื่องจากทำให้กุ้งมีขนาดเล็ก จึงขายได้ในราคาถูก

จะเห็นได้ว่าปัญหาสำคัญและอุปสรรคอย่างหนึ่งของการเลี้ยงกุ้งสำหรับการค้าก็คือโรคกุ้ง นอกจากนี้ยังมีอีกหลายสาเหตุที่ส่งผลให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคมากขึ้น อย่างไรก็ตาม

ตามปัญหาที่ร้ายแรงที่สุดในเรื่องโรคกุ้งสำหรับเกษตรกรไทยผู้ผลิตกุ้งกุลาดำขณะนี้คือโรคตัวแดงดวงขาว และโรคหัวเหลือง (Flegel, Boonyaratpalin and Withyachumnarnkul. 1997 ; Sithigorngul et al. 2000) และโดยเฉพาะโรคหัวเหลืองทำให้กุ้งตายรวดเร็วและรุนแรงมากที่สุด (ชลอ ลัมสุวรรณ. 2543)

โรคหัวเหลือง

โรคหัวเหลือง (yellow head disease) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง มีผลต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นการค้า ไม่เฉพาะประเทศไทยเท่านั้น ยังรวมไปถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮาวาย และประเทศแถบตะวันตก (Lu et al. 1994 ; Lu et al. 1995) โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำมีรายงานครั้งแรกบริเวณภาคตะวันออกและภาคกลางของประเทศ เมื่อปี 2533 ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่ธุรกิจการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก การระบาดของโรคหัวเหลืองบริเวณภาคใต้ของประเทศพบครั้งแรกจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงต้นปี 2535 หลังจากนั้นในราวปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคม โรคหัวเหลืองได้แพร่ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณรอบทะเลสาบสงขลาและแพร่เข้าสู่จังหวัดปัตตานีในราวกลางเดือนมิถุนายน (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535) ในปีเดียวกันได้มีการตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ โดยตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในบริเวณเหงือก ในเซลล์เม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง ในกุ้งที่ปรากฏอาการเป็นโรคหัวเหลือง ซึ่งทำให้ส่วนหัว ตับ ตับอ่อน และเหงือกจะมีสีเหลืองเห็นได้ชัดเจน พยาธิสภาพของกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองจะทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อและเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ อย่างไรก็ดีตามถ้ากุ้งได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง จะมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น กุ้งเริ่มเกาะขอบบ่อ การกินอาหารลดลง อ่อนเพลียไม่มีแรงติด ต่อมาจะมีอัตราการตาย 100% ภายใน 3 – 5 วัน หลังจากได้รับเชื้อ ซึ่งจะส่งผลโดยทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก (ชลอ ลัมสุวรรณ. 2543 ; สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535)

สัณฐานวิทยาของไวรัสหัวเหลือง

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและย้อมด้วยวิธี negative stain พบว่าไวรัสหัวเหลืองมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 50 – 60 x 190 – 200 nm ภายในเป็น nucleocapsid ล้อมรอบด้วย envelope ปุ่มปมหรือหนาม (Nadala, Tapay and Loh. 1997)

การศึกษาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่า ไวรัสมีจีโนม (genome) เป็นอาร์เอ็นเอ สายเดี่ยว (single stranded RNA) (Wongteerasupaya et al. 1995) ต่อมา Nadala, Tapay and Loh. (1997) ได้ทำการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของไวรัสด้วยวิธี SDS – PAGE (Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) และ Western blot พบว่า ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 170 135 67 และ 22 kDa ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135 kDa เท่านั้นที่เป็น glycosylated protein

ชนิดของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae

ชนิดกุ้งในวงศ์ Palaemonidae เช่น กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* กุ้งกะต๋อม *Macrobrachium sintangense* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*

ชนิดกุ้งในวงศ์ Penaeidae เช่น กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* และกุ้งหัวมันหรือ กุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis*

ชนิดกุ้งในวงศ์ Atyidae เช่น กุ้งกะปิ *Caridina sp.*

เปรียบเทียบลักษณะของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae

ขอบด้านหน้าและด้านท้ายของ pleuron แผ่นที่ 2 ทับ pleuron แผ่นที่ 1 และแผ่นที่ 3 ขาเดินคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 เป็นก้ามหนีบ และที่ปลายก้ามหนีบไม่มีพูชน ขาเดินคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่และยาวกว่าขาเดินคู่ที่ 1 ข้อที่ 5 ของขาเดินคู่ที่ 2 มีลักษณะเป็นข้อเดี่ยว ขาเดิน 3 คู่สุดท้ายไม่เป็นก้ามหนีบ อาศัยอยู่ในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล (พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. 2518)

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Penaeidae

กรีเจริญดี มีฟันทั้งด้านบนและด้านล่าง หรือมีเฉพาะด้านบนเท่านั้น หนามที่ cephalothorax บริเวณเหนือตับเจริญดี หนาม pterygostomial หนาม branchiostegal และฟันกรืออยู่เหนือกระเพาะอาหาร อาจมีหรือไม่มีก็ได้ ไม่มีหนามหลังตา หนามหลังหนวด และหนามเหนือตับ ร่องคอดยาวไม่ถึงด้านบนของ carapace ตาเจริญดีมี prosartema หนวดคู่ที่ 1

มีเส้นหนดเป็นรูปทรงกระบอก ฐานแบน ส่วนใหญ่จะยาวประมาณปล้องที่ 3 ของหนวดคู่ที่ 2 Mandibular palp มี 2 ปล้อง ปล้องที่ 2 มีขนาดกว้างและยาวกว่าปล้องแรก Maxillular palp อาจแบ่งเป็นปล้องหรือไม่แบ่งเป็นปล้องก็ได้ Second maxilla ประกอบด้วย scaphognathite ซึ่งมีลักษณะแบนกว้างใหญ่ Maxilliped ทุกคู่มี exopodite มีส่วนปลายกลมมนหรือตรง Third maxilliped มีลักษณะคล้ายขาเดิน บางครั้งอาจมีลักษณะต่างกันในกลุ่มเพศผู้และเพศเมีย ขาเดินมีลักษณะปกติ แต่บางครั้งใน 2 คู่สุดท้ายอาจมีขนาดยาวมากและมีลักษณะเรียวบาง ขาเดินที่มีส่วนปลายเป็นก้ามหนีบโดยมากจะมีความยาวเพิ่มขึ้นตามลำดับจากคู่แรกไปถึงคู่ที่ 3 ขาเดินคู่ที่ 1 ถึง 4 จะมี exopodite แต่ในขาเดินคู่ที่ 5 อาจมีหรือไม่มีก็ได้ บริเวณส่วนท้องปล้องท้าย ๆ ทางด้านบนจะมีสัน endopodite ของรยางค์ว่ายน้ำส่วนใหญ่เจริญดี แต่ในกลุ่มเพศผู้ endopodite ของรยางค์ว่ายน้ำคู่ที่ 2 จะมีขนาดเล็กและมี appendix masculina ติดอยู่ หางจะมีปลายแหลมและอาจมีหรือไม่มีหนามบริเวณด้านข้างก็ได้ Petasma อาจมีลักษณะสมมาตรหรือไม่สมมาตรก็ได้ (นงนุช ลีลาปิยะนาถ. 2532)

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Atyidae

กิ้งกิ้งเจริญดี สองปล้องสุดท้ายของฐานหนวดคู่ที่ 1 อย่างน้อยที่สุดมีความกว้างเท่ากับ ความยาว mandible ไม่มี mandibular palp ไม่มีร่องแยกระหว่าง incisor และ molar ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ไม่เท่ากัน และมีลักษณะเป็นก้ามหนีบ Carpus ไม่เป็นปล้อง ปลายของนิ้วทั้งสองมีลักษณะเป็นพู่ขน ปลายหางจะทู่และมน อาศัยอยู่ในน้ำจืดทั้งหมด พบได้ทั่วโลก ยกเว้นส่วนของ ขั้วโลก โดยมากพบในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (กัลยานี ยงจินตารัตน์. 2531)

กุ้งในวงศ์ Palaemonidae

กิ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus*

จัดอยู่ใน	Phylum Arthropoda
	Class Crustacea
	Order Decapoda
	Family Palaemonidae
	Genus Palaemon
	Species Styliferus (Holthuis. 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกิ้งก่าเปาะ มีดังนี้ (พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. 2518)

ลักษณะเด่น

กิ้งก่า มีลักษณะเรียวยาว ส่วนโคนของกิ้งก่าที่อยู่เหนือเบ้าตา โคนงูขึ้นส่วนปลายของกิ้งก่าขึ้น ส่วนโคนของข้อที่ 6 ของขาเดินคู่ที่ 2 พองเป็นกะเปาะ ลำตัวใสไม่มีสี ขอบทางด้านหน้าของ pleuron อันที่ 1 กับอันที่ 2 และขอบทางด้านท้ายของ pleuron อันที่ 2 กับอันที่ 3 มีพื้นสีเขียวอยู่แห่งละ 1 ปื้น

ลักษณะทั่วไป

กิ้งก่า เรียวยาว ส่วนโคนที่อยู่เหนือเบ้าตาโคนงูขึ้น ต่อจากส่วนโคนออกไปจนถึงปลายของกิ้งก่า มีลักษณะกลม ยาว เรียว และงอนขึ้นทำมุมประมาณ 40 องศา กับแนวราบประมาณ 1/2 ของความยาวของกิ้งก่า ยาวเลยปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ด้านบนของกิ้งก่ามีแฉะแบบฟันเลื่อย 7 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 1 อัน อยู่บนส่วนโคนงูเหนือตา 5 อัน และอยู่ที่ปลายกิ้งก่า 1 อัน แฉะ 6 อันแรกที่นับจากโคนของกิ้งก่า เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากันและอยู่ห่างจากแฉะอื่น อันสุดท้ายที่อยู่ปลายกิ้งก่ามาก ด้านล่างของกิ้งก่ามีแฉะแบบฟันเลื่อย 8 อัน อยู่ห่างกันเป็นระยะเท่ากันจากบริเวณที่ถัดเบ้าตาออกไปจนถึงปลายของกิ้งก่า ด้านข้างของกิ้งก่าตรงบริเวณเหนือตาเป็นสันเด่นชัด

Carapace ผิวเกลี้ยงเรียบ หนามตรงบริเวณหนวดมีขนาดเล็กกว่าหนามตรงบริเวณเหงือก สันของหนามทั้งสองขนานกัน

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 เป็นรูปไข่ ตอนปลายกลมรีและยาวเลยหนามแหลมที่ปลายขอบนอกของแผ่นออกไปมาก

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอก ยาว เรียว ส่วนโคนของข้อที่ 6 ยาวเลยแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ผิวโดยรอบเกลี้ยงเรียบ ข้อที่ 5 เป็นรูปกรวยยาวซึ่งโคนเล็กกว่าตอนปลายเล็กน้อย ส่วนโคนของข้อที่ 6 เป็นรูปทรงกระบอกตรงกลางพองออกคล้ายกะเปาะ นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบเป็นรูปทรงกระบอกแบนจากบนลงล่าง ตอนปลายงุ้มเข้า เมื่อหุบก้ามหนีบเข้ามาปลายที่แหลมจะชนกัน และเกิดช่องว่างระหว่างนิ้วทั้งสอง ด้านในของนิ้วทั้งสอง เกลี้ยงเรียบ

ไม่มีแ่งยื่นหรือสันยาว ข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวเรียงจากน้อยไปหามากตามลำดับ
 ดังนี้คือ ส่วนโคนของข้อที่ 6 ข้อที่ 4 ซึ่งยาวเท่ากับข้อที่ 5 และนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบ และข้อที่ 3

หางเป็นรูปสามเหลี่ยม ตอนปลายเรียวแหลมยาวไม่ถึงปลายของแพนหาง ผิวด้านบน
 มีหนามแหลม 2 คู่ เรียงอยู่ห่างจากโคนหางประมาณ $2/3$ และ $3/4$ ของความยาวของหาง

แพนหาง ปลายของแพนหางคู่นอก กลมรี ปลายของแพนหางคู่ในแหลมและเรียว

ไข่ เป็นรูปกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ $370\ \mu$

สี ลำตัวใสไม่มีสี ตอนปลายของกรีมีสีแดง ขอบหน้าของ pleuron อันที่ 1 กับ pleuron
 อันที่ 2 และขอบท้ายของ pleuron อันที่ 2 กับ pleuron อันที่ 3 มีปื้นสีเขียวยาวแห่งละ 1 ปื้น ปลาย
 หางมีสีแดง

ขนาดของลำตัว ความยาวของลำตัวโดยเฉลี่ย 75 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัย

อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีทางติดต่อกับทะเล พบปะปนอยู่กับกุ้งทะเลในฟาร์มกุ้ง

กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon Serrifer*

จัดอยู่ใน Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Palaemonidae

Genus Palaemon

Species Serrifer (Holthuis, 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกุ้งฝอยน้ำเค็ม มีดังนี้ (พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล.
 2518)

ลักษณะเด่น

เป็นกุ้งขนาดเล็ก อาศัยอยู่ในแอ่งน้ำของบริเวณชายฝั่งทะเลที่มีน้ำขึ้นถึง ลำตัวใสไม่มีสี
 ขาเดินคู่ที่ 2 ยาวเท่ากัน ผิวโดยรอบมีลายประสีน้ำตาล ตรงรอยต่อระหว่างข้อต่าง ๆ ของขาเดิน

คู่ที่ 2 กับตรงกลางของข้อที่ 5 ของขาเดินคู่ที่ 3 คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 มีสัมผัสแกมเหล็องคาตอยู่รอบข้อ กริตรงตอนปลายงอนขึ้นเล็กน้อย และยาวกว่าแผ่นกำบังหนวดของหนวดคู่ที่ 2 แง่ยื่นแบบฟันเลื่อยของกริด้านบนมี 11 อัน ด้านล่างมี 4 อัน

ลักษณะทั่วไป

กรี มีลักษณะตรง ปลายงอนขึ้นเล็กน้อย และยาวกว่าแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ด้านบนมีแง่งยื่นแบบฟันเลื่อย 11 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 3 อัน อยู่ถัดไปทางปลายของกรี 8 อัน แ่งยื่นแต่ละอันอยู่ห่างกันเป็นระยะเท่ากัน นอกจากแง่งอันแรกและอันสุดท้ายจะอยู่ห่างจากแง่งอันอื่น ๆ มาก ด้านล่างมีแง่งยื่นแบบฟันเลื่อย 4 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากันจากบริเวณที่อยู่ถัดจากเบ้าตาออกไปจนถึงปลายของกรี

แผ่นกำบังหนวดของหนวดคู่ที่ 2 ขอบด้านนอกตรง ตรงโคนของขอบด้านในโค้งออก และเรียวสอบเข้าไปทางปลาย

Carapace ผิวเกลี้ยงเรียบ สันของหนามตรงบริเวณหนวดและสันของหนามตรงบริเวณเหงือก ขนานกันในแนวราบ

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอก กลม ไม่เรียว ขาสองข้างยาวเท่ากันและยาวน้อยกว่าความยาวของลำตัว ข้อที่ 5 เป็นรูปกรวยยาว นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบเป็นรูปทรงกระบอกแบนจากบนไปล่าง ผิวรอบนอกตรงปลายนิ้วมีขนแข็งเรียงอยู่เป็นกระจุก ด้านในมีแง่งยื่น 1 อันอยู่ห่างจากโคนนิ้วประมาณ $1/4$ ของความยาวของนิ้วต่อจากแง่งยื่นออกไปเป็นสันคมยาวไปจนถึงปลายนิ้ว

ขาเดินคู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 เป็นรูปทรงกระบอก กลม ไม่ยาวเรียว ขาเดินทั้งสามคู่ มีความยาวใกล้เคียงกัน

หาง เป็นรูปสามเหลี่ยม ยาวไม่ถึงแพนหาง ผิวด้านบนมีหนามแหลม 2 คู่ อยู่ห่างจากโคนหางประมาณ $1/2$ และ $4/5$ ของความยาวหาง ตามลำดับ ปลายสุดของหางเป็นแง่งแหลมเล็ก และมีหนามแหลม 2 คู่ อยู่สองข้างของแง่งแหลม หนามแหลมคู่ในมีขนาดใหญ่และยาวกว่าหนามแหลมคู่นอก

แพนหาง ปลายของแพนหางคู่ในกลมรี แต่ปลายของแพนหางคู่นอกกลมมน

ไข่ มีลักษณะกลมรี ไข่ของกุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่มีสีเขียวอ่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 340 μ

สี ลำตัวใสไม่มีสี ขาเดินคู่ที่ 2 มีลายประสีน้ำตาล ตรงรอยต่อระหว่างข้อของขาเดินคู่ที่ 2 กับตรงกลางของข้อที่ 5 ของขาเดินคู่ที่ 3 คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 มีสีส้มแกมเหลืองคาอยู่โดยรอบ ขนาดของลำตัว ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย 27 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัย

อาศัยอยู่ตามซอกหินของแอ่งน้ำริมฝั่งทะเลที่มีน้ำขึ้นถึง และอยู่ในแหล่งน้ำที่มีทางติดต่อกับทะเล

กุ้งกะต๋อม *Macrobrachium sintangense*

จัดอยู่ใน Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Palaemonidae

Genus Macrobrachium

Species Sintangense (Holthuis. 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกุ้งกะต๋อม มีดังนี้ (พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. 2518)

ลักษณะเด่น

ก๊รี มีลักษณะเรียวยาว แง่ยื่นแบบฟันเลื่อยของก๊รีทางด้านบนมี 11 อัน ด้านล่างมี 6 อัน ลำตัวเป็นสีน้ำตาลหรือฟ้าแกมเขียว ขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวใกล้เคียงกับความยาวของลำตัวและมีป็นสีน้ำตาลกระจายอยู่เป็นหย่อม บริเวณรอยต่อระหว่างข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 3 คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 มีสีส้มแกมแดง

ลักษณะทั่วไป

กรี มีลักษณะเรียวยาวเลยแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ตอนปลายงอนขึ้นเล็กน้อย ขอบทางด้านบนของกรีมีแฉะแบบฟันเลื่อย 11 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 3 อัน และเรียงอยู่ถัดไปทางปลายกรี 8 อัน แฉะแต่ละอันเรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน นอกจากแฉะอันที่ 10 และอันที่ 11 จะอยู่ห่างจากแฉะอันที่ 9 ออกไปมาก ขอบทางด้านล่างของกรีมีแฉะแบบฟันเลื่อย 6 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน ด้านข้างของกรีเป็นสันยาวจากเบ้าตาไปจนถึงแฉะอันที่ 9 ของกรีด้านบน

Carapace ผิวเกลี้ยงเรียบ สันของหนามตรงบริเวณหนวดกับสันของหนามตรงบริเวณทับเรียงอยู่ขนานกันในแนวราบ หนามตรงบริเวณหนวดมีขนาดใหญ่ และยาวกว่าหนามตรงบริเวณทับ

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 มีลักษณะเรียวยาว ขอบทางด้านนอกมีลักษณะตรง ตอนโคนของขอบด้านในโค้งออกเล็กน้อยและเรียวยาวเข้าไปทางปลายของแผ่น

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกเรียวยาว ผิวโดยรอบของข้อที่ 3 เกลี้ยงและเรียบ ข้อที่ 4 ข้อ 5 และส่วนโคนของข้อที่ 6 มีลักษณะเหมือนกันคือ ผิวโดยรอบมีปื้นสีน้ำตาลอยู่เป็นหย่อม และมีหนามเล็ก ๆ เรียงกระจายอยู่ทั่วไป นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกเล็กและเรียวยาว ตอนปลายงุ้มเข้าเล็กน้อย เมื่อหุบก้ามหนีบเข้ามาปลายของนิ้วทั้งสองจะชนกัน ผิวโดยรอบเกลี้ยงและเรียบ และมีปื้นสีน้ำตาลกระจายอยู่เป็นหย่อม ตรงโคนทางด้านในของนิ้วตรงก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวได้มีปุ่มทู่อยู่ 3 อัน และของนิ้วตรงก้ามหนีบ ซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้มีแฉะยื่นรูปกรวย 1 อัน ต่อจากปุ่มหรือแฉะยื่นออกไปเป็นสันคม และยาวจนถึงปลายนิ้วที่งุ้ม ความยาวของข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวจากน้อยไปมาก ตามลำดับดังนี้คือ นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบข้อที่ 3 ซึ่งยาวเท่ากับส่วนโคนของข้อที่ 6 ข้อที่ 4 และข้อที่ 5

หางเป็นรูปสามเหลี่ยม ยาวไม่ถึงปลายของแพนหาง ผิวด้านบนโค้งมนเกลี้ยงและเรียบ และมีหนามแหลม 2 คู่ เรียงอยู่ห่างจากโคนหางประมาณ $1/2$ และ $3/5$ ของความยาวของหางตามลำดับ

แพนหาง ยาวเลยส่วนหางออกไปเล็กน้อย ปลายของแพนหางคู่นอก มีลักษณะกลมมน และปลายหางของแพนหางคู่ในมีลักษณะกลมรี

ไข่ มีลักษณะกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ $1,200 \mu$

สี ลำตัวเป็นสีน้ำตาลหรือสีฟ้าแกมเขียว ขาเดินคู่ที่ 2 มีปื้นสีน้ำตาลกระจายอยู่เป็นหย่อม ตรงรอยต่อระหว่างข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 3 คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 มีสีส้มแกมแดง หลังจากตองด้วยแอลกอฮอล์แล้ว สีเหล่านี้จะจางหายไป

ขนาดของลำตัว ความยาวของลำตัวโดยเฉลี่ย 63 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัย

อยู่ในแม่น้ำ ลำคลอง หรือแหล่งน้ำที่มีทางติดต่อกับทะเล

กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri*

จัดอยู่ใน Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Palaemonidae

Genus Macrobrachium

Species Lanchesteri (Holthuis, 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกุ้งฝอย มีดังนี้ (พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล, 2518)

ลักษณะเด่น

ก๊รี มีลักษณะตรงและยาวพอดีกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวเรียว และมีส่วนของก้ามหนีบ ยาวเลยปลายของก๊รี ขาสองข้างมีความยาวเท่ากัน ลำตัวใสไม่มีสี

ลักษณะทั่วไป

ก๊รี มีลักษณะตรงและยาวพอดีกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขอบบนมีแฉะยื่นแบบฟันเลื่อย 7 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 1 อัน เหนือเบ้าตา 4 อัน และที่ปลายของก๊รี 2 อัน แฉะแต่ละอันเรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน นอกจากแฉะ 2 อันสุดท้ายที่อยู่

ปลายกรี จะอยู่ห่างจากง่ามอื่นอันที่ 5 มาก ขอบล่างมีง่ามยื่นแบบฟันเลื่อย 3 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน ด้านข้างของกรีเป็นสันยาวจากเบ้าตาไปจนถึงง่ามอื่นอันที่ 6 ของกรีด้านบน

Carapace บริเวณผิวเกลี้ยงและเรียบ สันของหนามตรงบริเวณหนวดขนานกับสันของหนามตรงบริเวณตับและทำมุมกับแนวราบเล็กน้อย

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ค่อนข้างเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าและปลายมีลักษณะกลมมน ขอบด้านในขนานกับขอบด้านนอก

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวเรียว และขาสองข้างยาวเท่ากัน มีส่วนของก้ามหนีบยาวเลยปลายของกรี ผิวโดยรอบเกลี้ยงเรียบ นอกจากนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบจะมีกลุ่มขนที่แข็ง กระจายอยู่เป็นกลุ่ม ข้อที่ 5 เป็นรูปทรงกระบอกยาวและเรียวบางกว่าข้ออื่น ๆ ตอนกลางของส่วนโคนของข้อที่ 6 โป่งออกเล็กน้อย ด้านในของนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบมีง่ามยื่นรูปกรวยอยู่นิ้วละ 2 อัน เรียงอยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $1/4$ และ $1/3$ ของความยาวของนิ้วตามลำดับ ข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวเรียงจากน้อยไปหามากตามลำดับดังนี้ นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบ ข้อที่ 3 ส่วนโคนของข้อที่ 6 ข้อที่ 4 และข้อที่ 5

หาง เป็นรูปสามเหลี่ยมยาวเรียวและยาวไม่ถึงปลายของแพนหาง ปลายสุดเป็นแฉกแหลมเล็กและมีหนามแหลม 2 คู่ อยู่สองข้างของแฉกแหลม หนามคู่ในมีขนาดใหญ่และยาวกว่าหนามคู่นอก ผิวด้านบนของหางโค้งมนและมีหนามแหลม 2 คู่ อยู่ห่างจากโคนของหางประมาณ $1/2$ และ $3/4$ ของความยาวของหาง

แพนหาง ยาวเลยหางออกไปเล็กน้อย ปลายของแพนหางคู่ในกลมรี และปลายของแพนหางคู่นอกกลมมน

ไข่ เป็นรูปกลมรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ $700\ \mu$

สี ลำตัวใส ไม่มีสี

ขนาดของลำตัว ความยาวของลำตัวโดยเฉลี่ย 37 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัย

อาศัยอยู่ในแม่น้ำ คู คลอง หนอง บึง หรือเกาะอยู่ตามก้อนหินใหญ่ในแอ่งน้ำตก

กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*

จัดอยู่ใน Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Palaemonidae

Genus Macrobrachium

Species Rosenbergii (Holthuis, 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัยของกุ้งก้ามกราม มีดังนี้ (พิมลพรรณ สีสะวัฒนากุล, 2518)

ลักษณะเด่น

กริส่วนโคนที่อยู่เหนือตาโค้งนูนขึ้น และส่วนปลายเรียวงอนขึ้น แฉ่ยื่นแบบฟันเลื่อยของกริ ด้านบนและกริด้านล่างมีจำนวนใกล้เคียงกันคือประมาณ 12 – 13 อัน ขาเดินคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่และยาวไม่เท่ากัน ผิวด้านนอกของขาเดินมีหนามแหลมเรียงอยู่กระจัดกระจายนอกจากนี้ของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวได้ จะมีขนปุกปุยคลุมอย่างหนาแน่น

ลักษณะทั่วไป

กริส่วนโคนที่อยู่เหนือตาโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย ส่วนปลายมีลักษณะเรียวงอนขึ้น และยาวเลยปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ด้านบนของกริมีแฉ่ยื่นแบบฟันเลื่อย 13 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 2 อัน อยู่บนส่วนโค้งนูนเหนือตา 4 อัน และเรียงอยู่ถัดไปทางปลายของกริ 7 อัน แฉ่ยื่น 2 อัน ที่อยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace กับแฉ่ยื่น 3 อัน ที่อยู่ปลายสุดของกริ จะเรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน และมีระยะห่างมากกว่าระยะห่างระหว่างแฉ่ยื่นของกริที่อยู่บนส่วนโค้งนูนเหนือตา แต่มีระยะห่างน้อยกว่าระยะห่างระหว่างแฉ่ยื่นของกริ 3 อัน ที่อยู่ถัดจากส่วนโค้งนูนเหนือตาออกไปทางปลายของกริ ด้านล่างของกริมีแฉ่ยื่นแบบฟันเลื่อย 13 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากันตลอดความยาวของกริ ด้านข้างของกริเป็นสันยาวจากเบ้าตาไปจนถึงแฉ่ยื่นอันที่ 9 หรืออันที่ 10 ของกริทางด้านบน

Carapace ผิวเกลี้ยงเรียบ นอกจากบริเวณหัวใจ บริเวณกระเพาะอาหารและบริเวณที่อยู่เหนือหนามตรงบริเวณตับ มีเม็ดเล็ก ๆ อยู่กระจัดกระจาย สันของหนามตรงบริเวณหนวดและสันของหนามตรงบริเวณตับ ขนานกันและทำมุมกับแนวราบเล็กน้อย

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขอบด้านนอกตรง ขอบด้านในตรงและขนานกันกับขอบด้านนอก ปลายของแผ่นเรียวแหลม

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวไม่เท่ากัน ขาข้างที่ยาวจะมีส่วนปลายของข้อที่ 4 อยู่ตรงกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ข้อที่ 3 ข้อที่ 4 และข้อที่ 5 เป็นรูปทรงกระบอก ตอนปลายของข้อหนากว่าตอนโคน คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 3 ต่อ 2 ส่วนโคนของข้อที่ 6 เป็นรูปทรงกระบอกแบนจากบนมาล่างเล็กน้อย และมีความกว้างเท่ากันตลอดผิวโดยรอบของข้อที่ 3 ข้อที่ 4 ข้อที่ 5 และส่วนโคนของข้อที่ 6 มีหนามแหลมเรียงกระจายเป็นแถว ซึ่งหนามแหลมที่อยู่บนผิวด้านนอกมีขนาดเล็กและสั้นกว่าหนามแหลมที่อยู่บนผิวด้านใน นิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก มีขนาดเล็กและเรียวกว่าส่วนโคนของข้อที่ 6 ตอนปลายแหลมและงุ้มเข้า ผิวด้านนอกของนิ้วมีหนามแหลมและเล็กเรียงอยู่กระจัดกระจาย นอกจากตอนปลายที่แหลมและงุ้มเข้า จะเกลี้ยงเรียบ ด้านในของนิ้วมีปุ่ม 2 ปุ่มติดกัน และแฉ่ยื่นรูปกรวย 1 อันอยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $\frac{1}{7}$ และ $\frac{1}{4}$ ของความยาวนิ้วตามลำดับ ถัดจากแฉ่ยื่นรูปกรวยออกไปเป็นสันคมและยาวไปจนถึงปลายที่แหลมงุ้ม นิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวได้ เป็นรูปทรงกระบอกและมีขนาดเท่ากับนิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้ ผิวด้านนอกของนิ้วที่มีขนปุกปุยและยาวคลุมอย่างหนาแน่นอยู่ตลอดความยาวของนิ้ว นอกจากตอนปลายที่แหลมงุ้มเข้า จะเกลี้ยงเรียบ ด้านในของนิ้วมีแฉ่ยื่นรูปกรวยที่มีขนาดเท่ากัน 2 อัน อยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $\frac{1}{5}$ และ $\frac{1}{4}$ ของความยาวนิ้วตามลำดับ ถัดจากแฉ่ยื่นอันที่ 2 ออกไปเป็นสันคมและยาวไปจนถึงปลายของนิ้วที่แหลมงุ้ม เมื่อหุบก้ามหนีบเข้ามาปลายของนิ้วนี้จะเกยกับปลายของนิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้ ข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวจากน้อยไปหามากตามลำดับดังนี้ ข้อที่ 3 ข้อที่ 4 ข้อที่ 5 ส่วนโคนของข้อที่ 6 และนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบซึ่งมีความยาวเท่ากัน

หาง เป็นรูปสามเหลี่ยม ตอนปลายเป็นแฉ่แหลมเล็ก สองข้างของแฉ่แหลม มีหนามแหลม 2 คู่ คู่ในมีขนาดใหญ่และยาวกว่าคู่นอก

แพนหาง ปลายของแพนหางคู่นอก มีลักษณะตัดเป็นเส้นตรงและปลายของแพนหางคู่ในเรียวแหลมเล็กน้อย

ไข่ เป็นรูปกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 500 μ

สี ลำตัวเป็นสีน้ำเงินแกมเขียว ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นสีน้ำเงินเข้ม

ขนาดของลำตัว มีความยาวโดยเฉลี่ยประมาณ 190 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัย

พบในแม่น้ำ ลำคลอง ลำห้วย ลำธาร ทะเลสาบ หรือแหล่งน้ำที่มีทางติดต่อกับทะเล

กุ้งในวงศ์ Penaeidae

กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* , Jinga shrimp

จัดอยู่ใน Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus Metapenaeus

Species Affinis (Holthuis. 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ลักษณะລາວລາຍສີຂອງລຳຕົວກຸ້ງຕະກາດ ມີດັ່ງນີ້ (ນงຸຂ ສີລາປະຍະນາຄ. 2532)

ลักษณะเด่น

กริยาวเรียว ส่วนปลายโค้งขึ้นเล็กน้อย ปลายกริสีสิ้นสุดบริเวณปลายกำหนดคู่ที่ 1 ขอบด้านบนมีฟัน 8 ถึง 10 ซี่ ขอบด้านล่างเรียบไม่มีฟัน ขาเดินคู่ที่ 1 ไม่มีหนาม ischial สันที่อยู่ระหว่างเหงือกกับหัวใจมองเห็นชัด Petasma มีส่วนหน้าของพู่ตรงกลางแต่ละข้างคล้ายเสี้ยวพระจันทร์ซ้อนทับส่วนหน้าของพู่ด้านข้าง Thelycum มีขนปกคลุมจำนวนมาก แผ่นด้านหน้ามีรูปร่างคล้ายเครื่องบิน แต่มีส่วนหน้าค่อนข้างใหญ่ แผ่นด้านข้างมีลักษณะแบนกลมแบ่งออกเป็น 2 แผ่นคือ แผ่นทางด้านบนและแผ่นทางด้านล่าง ซึ่งจะซ้อนกันเล็กน้อย Carapace และลำตัวมี

สีน้ำตาล มีจุดสีเขียว แดง และน้ำตาลกระจายอยู่ประปรายทั่วไป สันด้านบนท้องปล้องที่ 5 ถึง 6 มีสีน้ำตาลแดงเข้ม แพนหางมีสีน้ำตาลแดงเข้ม บริเวณส่วนปลายมีสีฟ้า มีขนสีแดงอยู่รอบ ๆ โดยทั่วไปกุ้งที่พบมีความยาวลำตัวทั้งหมดประมาณ 49 ถึง 123 มิลลิเมตร

ลักษณะทั่วไป

กริยาวเรียว ส่วนปลายโค้งขึ้นเล็กน้อย ปลายกริาสั้นสุดบริเวณปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 ความยาวกริประมาณ $2/3$ ของความยาว carapace ขอบด้านบนมีฟัน 8 ถึง 10 ซี่ (ส่วนใหญ่มี 8 ถึง 9 ซี่) ฟันกริ 2 ซี่หลังอยู่บน carapace ขอบด้านล่างเรียบไม่มีฟัน สันหลังกริยาวไม่ถึงขอบด้านหลังของ Carapace ด้านบนไม่มีร่อง สันข้างกริยาวถึงกึ่งกลางระหว่างฟันกริที่อยู่เหนือกระเพาะอาหารและฟันกริซี่แรก ร่องข้างกริยาวเลยฟันกริที่อยู่เหนือกระเพาะอาหาร

Carapace มีขนปกคลุมอยู่ทั่วไป ยกเว้นบริเวณขอบด้านหลังและขอบด้านล่างของ carapace ร่องที่อยู่บริเวณด้านหน้ากระเพาะอาหารลึกและเอียงทำมุมประมาณ 40 ถึง 45 องศา กับกริ ร่องที่อยู่ระหว่างตากับหนวดมีลักษณะกว้างและตื้น ส่วนปลายโค้งลงมาถึงร่องตับ ติดต่อเป็นร่องเดียวกับร่องตับ ร่องตับเอียงลงทางด้านหน้าเกือบถึงส่วนปลายของมุม pterygostomian ร่องคอมมีลักษณะตรงและเอียงไปทางด้านหลังยาวประมาณ $1/4$ ของความยาว carapace ร่องที่อยู่ระหว่างเหงือกกับหัวใจมีลักษณะตื้น มองเห็นไม่ชัดเจน และอยู่ทางด้านบนของสันที่อยู่ระหว่างเหงือกกับหัวใจ หนามที่เจริญดี ได้แก่ หนามหนวดและหนามเหนือตา ซึ่งมีขนาดเล็กลงตามลำดับ

หนวดคู่ที่ 1 มี prosartema เจริญดี ส่วนปลายยาวเกือบถึงปลายปล้องแรกของก้านหนวดคู่ที่ 1 Stylocerite มีส่วนปลายอยู่ประมาณ $1/2$ ของปล้องแรกของก้านหนวดคู่ที่ 1 ปล้องที่ 2 ของก้านหนวดคู่ที่ 1 มีความยาวน้อยกว่าปล้องแรกเล็กน้อย และยาวเป็น 2 เท่าของปล้องที่ 3 เส้นหนวดคู่ที่ 1 มีแขนงอันนอกยาวกว่าแขนงอันในเล็กน้อย แขนงอันนอกมีความยาวประมาณ $1/3$ ของความยาว carapace หนวดคู่ที่ 2 มีส่วนปลายของ scaphocerite ยาวเลยปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 เล็กน้อย Caphocerite ยาวประมาณ $2/5$ ของความยาว scaphocerite

Maxilliped คู่ที่ 3 มีส่วนปลายยาวถึงปลาย caphocerite ของหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 1 เมื่อเหยียดตรงมีส่วนปลายอยู่ต่ำกว่าส่วนปลายของ maxilliped คู่ที่ 3 เล็กน้อย มีหนาม basial แลมนยาว ไม่มีหนาม ischial ขาเดินคู่ที่ 2 มีส่วนปลายยาวถึงบริเวณปลายปล้องแรกของก้านหนวดคู่ที่ 1 มีหนาม basial ขนาดใกล้เคียงกับที่พบในขาเดินคู่แรก ขาเดินคู่ที่ 3 มี $1/2$ ของ

นิวทัมหนีบยาวเลย scaphocerite มีหนาม basial ขนาดใกล้เคียงกับที่พบในขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ขาเดินคู่ที่ 4 มีขนาดสั้น ส่วนปลายยาวถึงปลาย caphocerite ของหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 5 มีส่วนปลายยาวถึงปลาย scaphocerite

ส่วนท้องมีขนเล็ก ๆ ปกคลุมอยู่ทั่วไป ยกเว้นบริเวณที่เป็นสันนูน ปล้องแรกของส่วนท้องมีผิวด้านบนเรียบ ไม่มีสันนูน ปล้องที่ 2 จะมีสันนูนเล็กน้อยประมาณ 1/2 ของครึ่งหลังของปล้อง ปล้องที่ 3 มีสันนูนเล็กน้อย ตลอดความยาวของปล้อง ส่วนในปล้องที่ 4 ถึง 6 จะมีสันนูนสูงบริเวณผิวด้านบนปล้อง ผิวด้านข้างของส่วนท้องไม่เรียบ จะมีสันนูนหลายแห่ง

ส่วนหางมีขนเล็ก ๆ ปกคลุมทั่วไปเช่นเดียวกับ carapace และส่วนท้องบริเวณด้านข้างไม่มีหนาม ส่วนปลายของหางอยู่ในระดับเดียวกับส่วนปลายของแพนหางอันในหางมีความยาวประมาณ 3/5 ของความยาว carapace

Petasma มีส่วนหน้าของพุตรงกลางแต่ละข้างคล้ายเสี้ยวพระจันทร์ ซ้อนทับส่วนหน้าของพุด้านข้าง แต่ก็สามารถมองเห็นปลายของพุด้านข้างโผล่ออกมาเล็กน้อย

Thelycum มีขนปกคลุมจำนวนมาก แผ่นด้านหน้ามีรูปร่างคล้ายเครื่องบิน แต่มีส่วนหน้าค่อนข้างใหญ่ แผ่นด้านข้างมีลักษณะแบนกลม แบ่งออกเป็น 2 แผ่น คือแผ่นทางด้านบนและแผ่นทางด้านล่าง ซึ่งจะซ้อนกันเล็กน้อย

ลักษณะลดทอนสีของลำตัว

Carapace และลำตัวมีสีน้ำตาล มีจุดสีเขียว แดง และน้ำตาลกระจายอยู่ประปรายทั่วไป ส่วนที่อยู่ด้านบนของท้องปล้องที่ 5 และ 6 จะมีสีน้ำตาลแดงเข้ม แพนหางมีสีน้ำตาลแดงเข้ม บริเวณส่วนปลายมีสีฟ้า มีขนสีแดงอยู่รอบ ๆ ขาเดินมีสีน้ำตาลอมแดง มีจุดสีแดงกระจายอยู่ประปรายทั่วไป ขาวายน้ำมีสีแดง เส้นหนวดคู่ที่ 2 มีสีแดง

กุ้งหัวมัน กุ้งสี่ กุ้งไข่เหลือง กุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis*, Yellow shrimp

จัดอยู่ใน Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

11/11/55
55

Genus *Metapenaeus*

Species *Brevicornis* (Holthuis. 1980)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ลักษณะสวดลายสีของลำตัวของกุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง
มีดังนี้ (นงนุช ลีลาปิยะนาถ. 2532)

ลักษณะเด่น

กริยาวตรง โคนกริมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ปลายกริยาวถึงปลายปล้องที่ 2 ของก้านหนวดคู่ที่ 1 (ในกุ้งเพศผู้ปลายกริจะยาวแค่ปลายปล้องแรกของก้านหนวดคู่ที่ 1) ความยาวกริประมาณ $1/2$ ของความยาว carapace ขอบด้านบนส่วนปลายทางด้านหน้าของกริมีลักษณะเรียบ ไม่มีฟัน ครึ่งหลังมีฟัน 5 ถึง 7 ซี่ ขอบด้านล่างเรียบไม่มีฟัน ขาเดินคู่ที่ 1 มีหนาม ischial ขนาดใกล้เคียงกับหนาม basial ปลายหางมีหนามขนาดเล็กมาก เคลื่อนไหวได้ อยู่ 1 คู่ Petasma มีส่วนหน้าของพู่ด้านข้างที่ยื่นออกมา ชี้ออกทางด้านนอก ส่วนหน้าของพู่ตรงกลางจะมีติ่งยื่นออกมาลักษณะเรียวยาวแหลม Thelycum มีแผ่นด้านหน้าเป็นรูปสี่เหลี่ยมซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าแผ่นด้านข้างซึ่งอยู่ทางด้านล่างของแผ่นด้านหน้า Carapace และลำตัวมีสีเหลือง มีจุดสีน้ำตาลแดงและเขียวกระจายอยู่ทั่วไป แพนหางมีสีค่อนข้างแดง โดยทั่วไปกุ้งที่พบมีความยาวลำตัวทั้งหมดประมาณ 43 ถึง 129 มิลลิเมตร

ลักษณะทั่วไป

กริยาวตรง โคนกริมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ปลายกริจะยาวถึงปลายปล้องที่ 2 ของก้านหนวดคู่ที่ 1 (ในกุ้งเพศผู้ปลายกริจะยาวถึงปลายปล้องแรกของก้านหนวดคู่ที่ 1) ความยาวกริประมาณ $1/3$ ของความยาว carapace ขอบด้านบนส่วนปลายทางด้านหน้าของกริมีลักษณะเรียบ ไม่มีฟัน ครึ่งหลังมีฟัน 5 ถึง 7 ซี่ (ส่วนใหญ่มี 6 ซี่) ฟันกริ 3 ซี่ ซี่หลังอยู่บน carapace ขอบด้านล่างเรียบ ไม่มีฟัน สันหลังกริมีลักษณะนูนขึ้นเล็กน้อย ยาวไม่ถึงขอบด้านหลังของ carapace สันข้างกริยาวถึงฟันกริซี่แรก

Carapace มีผิวเรียบเป็นมัน มีร่องตื้นเจริญดีเห็นได้ชัดเจน มีลักษณะเอียงลงทางด้านหน้า ร่องคอมีลักษณะเป็นร่องตื้น ๆ มองเห็นไม่ชัดเจนและมีขนาดสั้น สันที่อยู่ระหว่าง

เหงือกกับหัวใจมีลักษณะเป็นสันนูนขึ้นเล็กน้อย มองเห็นไม่เด่นชัด หนามที่เจริญดี ได้แก่ หนามหนวดและหนามดับซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน

หนวดคู่ที่ 1 มี prosartema เจริญดี และยาวไม่ถึงปลายปล้องแรกของก้านหนวดคู่ที่ 1 Stylocerite ยาวประมาณกึ่งกลางของ cornea เส้นหนวดคู่ที่ 1 มีแขนงอันนอกยาวกว่าแขนงอันใน แขนงอันนอกมีความยาวประมาณ $1/3$ ของความยาว carapace หนวดคู่ที่ 2 มี scaphocerite ยาวเลยปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 เล็กน้อย Caphocerite ยาวถึงกึ่งกลางของ scaphocerite

Maxilliped คู่ที่ 3 มีส่วนปลายยาวถึงส่วนปลายของ caphocerite ของหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 1 มีส่วนปลายยาวประมาณกึ่งกลางของ caphocerite ของหนวดคู่ที่ 2 บริเวณปล้องเบสิสมีหนามแหลมขนาดใกล้เคียงกับหนามของปล้อง ischial ขาเดินคู่ที่ 2 มีส่วนปลายอยู่ที่บริเวณปลายปล้องแรกของก้านหนวดคู่ที่ 1 มีหนามแหลมบริเวณปล้องเบสิสและมีขนาดใหญ่กว่าที่พบในขาเดินคู่แรก ขาเดินคู่ที่ 3 มีส่วนปลายยาวถึงบริเวณปลาย scaphocerite ของหนวดคู่ที่ 2 มีหนามบริเวณปล้องเบสิสซึ่งมีขนาดเท่ากับที่พบในขาเดินคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 4 มีขนาดสั้น มีส่วนปลายอยู่ที่กึ่งกลาง caphocerite ของหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 5 มีขนาดยาวมาก และมีลักษณะเรียวยาวเล็ก $1/2$ ของส่วนโปรโปคัสจะยาวเลย scaphocerite

ส่วนท้อง ปล้องที่ 1 ถึง 3 จะมีผิวด้านบนเรียบกลมมน $2/3$ ของปล้องที่ 4 จะเริ่มมีสัน และมีตลอดจนถึงปล้องที่ 6 ส่วนท้องทุกปล้องมีผิวเรียบเป็นมันเช่นเดียวกับ carapace

ส่วนหาง เรียบไม่มีขนปกคลุม ปลายหางมีหนามขนาดเล็กมาก เคลื่อนไหวได้อยู่ 1 คู่ ส่วนปลายยาวไม่ถึงส่วนปลายของแพนหางอันใน แพนหางอันนอกจะมีขอบตรงหางมีความยาวประมาณ $1/2$ ของความยาว carapace

Petasma มีส่วนหน้าของพู่ด้านข้างที่ยื่นออกมาชี้ออกทางด้านนอก ส่วนหน้าของพู่ตรงกลางจะมีติ่งยื่นออกมาลักษณะเรียวยาวแหลม

Thelycum มีแผ่นด้านหน้าเป็นรูปสี่เหลี่ยมซึ่งมีขนาดใหญ่เท่าแผ่นด้านข้างซึ่งอยู่ด้านล่างของแผ่นด้านหน้า ในกึ่งเพศเมียที่มีไข่จะพบแผ่นสีขาวปิดอยู่

ลักษณะລาดลายสีของลำตัว

Carapace และลำตัวมีสีออกเหลือง มีจุดสีน้ำตาลแดงและเขียวกระจายอยู่ทั่วไป สำหรับในกึ่งเพศเมียที่มีไขบริเวณด้านบนของ carapace และลำตัวจะเห็นแถบสีเขียวปนเหลือง พาดตลอดแนวความยาวลำตัว ขาเดินมีสีเช่นเดียวกับลำตัว ขาวายน้ำมีสีเหลืองออกส้ม หนวดคู่ที่ 2 มีสีน้ำตาลแดง ส่วนปลายของแพนหางมีสีค่อนข้างแดง

กึ่งในวงศ์ Atyidae

กึ่งกะปิ *Caridina* sp.

จัดอยู่ใน Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Atyidae

Genus Caridina

Species - (Holthuis, 1980)

ลักษณะทั่วไปของกึ่งกะปิ มีดังนี้ (กัลยานี ยงจินดารัตน์, 2531)

ลักษณะทั่วไปของ Family Atyidae

กรีเจริญดี สองปล้องสุดท้ายของฐานหนวดคู่ที่ 1 อย่างน้อยที่สุดมีความกว้างเท่ากับ ความยาว mandible ไม่มี mandibular palp ไม่มีร่องแยกระหว่าง incisor และ molar ขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ไม่เท่ากันและมีลักษณะเป็นก้ามหนีบ Carpus ไม่เป็นปล้อง ปลายของนิ้วทั้งสองมี ลักษณะเป็นพู่ขน ปลายหางจะทุ้มและมน อาศัยอยู่ในน้ำจืดทั้งหมด พบได้ทั่วโลก ยกเว้นส่วนของ ขั้วโลก โดยมากพบในเขตร้อนและเขตอบอุ่น

ลักษณะทั่วไปของ Genus Caridina

กรีเรียบหรือมีฟัน ไม่มีหนามเหนือเบ้าตา มีหนามบริเวณด้านข้างของ carapace ส่วนหน้าซึ่งใกล้กับฐานหนวดคู่ที่ 2 Pterygostomial angle มน ส่วนปลาย carpus ของขาเดิน

คู่ที่ 1 จะว่ามีลักษณะคล้ายถ้วย ขาเดินคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 มีลักษณะเป็นก้ามหนีบ บริเวณส่วนปลายของนิ้วทั้งสองมีขนเป็นพู่ ซึ่งความยาวของพู่ขนจะสั้นกว่าความยาวของนิ้ว ขาเดินคู่ที่ 1 จะสั้นกว่าขาเดินคู่ที่ 2 ขาเดินไม่มี exopod แต่มี arthrobranch

การศึกษาและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไวรัสหัวเหลือง

Anderson and Prior. (1992) ได้รายงานการพบ non-occluded baculovirus โดยศึกษาในปูทะเล *Scylla serrata* และกุ้ง crayfish *Cherax quadricarinatus* จากประเทศออสเตรเลียทั้งในระยะวัยรุ่น (juvenile) และตัวเต็มวัย จากการรวบรวมกุ้ง crayfish จากฟาร์มในรัฐ Queensland ทั้งหมดจำนวน 61 ตัวมาทำการศึกษา พบกุ้ง 32 ตัว (52 %) ได้รับเชื้อ baculovirus จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา ด้วยการนำตับและตับอ่อนมา fix ใน Davidson's fixative และผ่านกระบวนการทาง histology แล้วตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสี haematoxylin และสี eosin (H & E) นอกจากนี้ยังได้นำสี Giemsa alcianblue Gram Feulgen และ periodic acid-Schiff (PAS) ย้อมเนื้อเยื่อตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะของ inclusion พบว่า ภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนของ crayfish มี eosinophilic inclusion และพบว่าเซลล์เยื่อบุผิวของตับและตับอ่อนที่ได้รับเชื้อไวรัสมีนิวเคลียสขยายใหญ่กว่าเดิมถึง 2.5 เท่าของเซลล์ปกติ Inclusion มีสีแดง แต่บาง inclusion ก็มีสีม่วงแดงและไม่ติดสี PAS, Giemsa Gram Feulgen และ alcian blue เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า nucleocapsid มีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอก ขนาดโดยเฉลี่ย 34×154 nm อนุภาคไวรัสมีความยาว 172 – 220 nm มี envelope ปกคลุมอยู่อย่างหลวม ๆ ในขณะที่ปูทะเล *Scylla serrata* พบว่า 27 % ของตัวอย่างที่รวบรวมได้ได้รับเชื้อ baculovirus และมี basophilic inclusion ภายในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวตับและตับอ่อน Inclusion เหล่านี้ย้อมไม่ติดสี PAS, Giemsa alcian blue และ Feulgen นิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวของตับและตับอ่อนขยายใหญ่ขึ้นถึง 5 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ Nucleocapsid มีรูปร่างเป็นแท่งทรงกระบอกเช่นเดียวกับที่พบใน crayfish ขนาดโดยเฉลี่ย 24×205 nm อนุภาคของไวรัสมีความยาว 24 – 253 nm มี envelope หุ้มและมีโครงสร้างคล้ายเส้นใยยื่นออกมาจาก envelope

ในปี 1993 Chantanachookin et al. ได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีอาการของโรคหัวเหลือง ด้วยการนำกุ้งที่ไกล่ตายมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง

ธรรมดา พบว่าลักษณะของเนื้อเยื่อของอวัยวะน้ำเหลืองมีลักษณะผิดปกติอย่างเห็นได้ชัดจน มี การตาย (necrosis) ของเซลล์ พบเซลล์ที่มีแวคิวโอล (vacuole) และนิวเคลียสรวม ใน cytoplasm พบ inclusion ที่ติดสีเบสอยู่ใกล้กับนิวเคลียสที่บวม Inclusion นี้ยังพบในเนื้อเยื่อระหว่างเซลล์ ตับ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) กล้ามเนื้อหัวใจ เนื้อเยื่อเหงือก และ เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue) ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้จะไม่เหมือนกับโรคที่เกิดจาก เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือเชื้อปรสิต เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบไวรัสหัวเหลืองมีรูปร่างเป็น rod-shaped virus และมี envelope หุ้ม ไวรัสนี้อยู่ใน ส่วน cytoplasm ที่ติดกับนิวเคลียสของเซลล์จากเนื้อเยื่อหลายชนิด ยังพบไวรัสที่อยู่เป็นอิสระใน ที่ว่างระหว่างเซลล์ นอกจากนี้ไวรัสหัวเหลืองยังคล้ายคลึงกับ granulosis virus (Baculoviridae) ในแมลง ในส่วนของตำแหน่งที่พบใน cytoplasm ขนาด รูปร่าง และการพัฒนาของไวรัส

Lu et al. (1994) ได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง 2 ชนิด คือ *Penaeus stylirostris* (blue shrimp) และ *Penaeus vannamei* (white shrimp) ซึ่งเป็นกุ้งที่เลี้ยงกันมาก ใน ฮาวาย และประเทศแถบตะวันตก โดยการสกัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจาก cephalothorax tissue ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* จากประเทศไทยแล้วฉีดเข้าไปในกล้ามเนื้อของกุ้งทั้ง 2 ชนิด พบว่ากุ้งแสดงอาการของโรคตั้งแต่วันที่ 2 หลังจากทำให้ติดเชื้อ (post injection) จน ตายหมดทั้งสองชนิดในวันที่ 6 อาการที่พบคือกุ้งอ่อนเพลีย ทรงตัวไม่ได้ ไม่รู้สึกต่อสิ่งกระตุ้น ภายนอก เปลือกเปลี่ยนเป็นสีแดง ไม่พบสีเหลืองของตับและตับอ่อนและเหงือกเหมือนที่พบใน กุ้งกุลาดำ ส่วนการศึกษาทาง histopathology พบมีการตายของเซลล์เป็นจำนวนมากใน ectodermal tissue และ mesenchymal tissue และจากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนที่ตรวจจากเซกชันที่บางของเหงือก และตับและตับอ่อนพบลักษณะ non-occluded rod-shaped baculo-like virus ขนาด $130 - 197 \times 45 - 48$ nm ซึ่งพบใน cytoplasm ของ เซลล์ที่ติดเชื้อ ผลสรุปที่ได้คือกุ้ง 2 ชนิดนี้สามารถติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเวลาใกล้เคียงเช่น เดียวกับกุ้งกุลาดำ

Lu et al. (1995) ได้รายงานถึงการแพร่กระจายของไวรัสหัวเหลือง ตามอวัยวะและ เนื้อเยื่อต่าง ๆ สามารถระบุอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ ทำให้ง่ายต่อการสกัดและ ตรวจสอบเชื้อนี้ได้ โดยศึกษาในเนื้อเยื่อและอวัยวะ 9 ส่วนจากกุ้ง *Penaeus vannamei* ที่ทำให้ ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการฉีดด้วยส่วนที่สกัดจาก cephalothorax ของกุ้งที่ทำให้ติดเชื้อไวรัส หัวเหลือง นำส่วนเหงือก ตับและตับอ่อน หัวใจ เส้นประสาท head soft tissue กล้ามเนื้อ ส่วน

ห้อง ก้านดา อวัยวะน้ำเหลือง (Oka) และ mid gut ไปทดสอบ bioassay โดยใช้กุ้ง penaeid เป็นตัวเปรียบเทียบ และจากการทำ quantal assay 50 % Tissue culture infective dose (TCID₅₀) ใน primary Oka cell culture ของกุ้ง พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในทุกเนื้อเยื่อและอวัยวะที่ศึกษา เมื่อฉีดของเหลวที่ได้จากเนื้อเยื่อและอวัยวะเหล่านี้ให้กุ้ง พบว่ากุ้งทั้งหมดที่ทำการทดสอบตายภายใน 6 - 9 วัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทดสอบด้วย TCID₅₀ assay กับ primary Oka cell culture พบว่า Oka หัวใจ และ head soft tissue มีปริมาณ (titer) ของไวรัสหัวเหลืองสูงกว่าในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่น ๆ ถึง 10 - 800 เท่า ดังนั้นอวัยวะ 3 ส่วนนี้จึงน่าจะเป็นที่สะสมของ ไวรัสมากที่สุด จึงควรใช้อวัยวะ 3 ส่วนนี้ใช้ในการตรวจสอบศึกษาไวรัสหัวเหลือง

Kasornchandra and Boonyaratpalin. (1995) ได้ศึกษาขั้นตอนการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสหัวเหลืองในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำด้วยการฉีดสารสกัดจากไวรัสเข้าในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำปริมาตร 0.1 ml ต่อตัว จำนวน 20 ตัว จากนั้นเก็บอวัยวะน้ำเหลืองหลังจากฉีดไวรัสที่เวลา 12 18 24 32 48 และ 56 ชั่วโมง นำอวัยวะน้ำเหลืองมา fix ใน 6.25% glutaraldehyde ใน Sorensen buffer เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผ่านการดึ่งน้ำออก หลังจากนั้น fix ใน O₃O₄ อีกครั้งและ embed ใน Epon-812 แล้วนำมาย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ระยะเวลาของการเกิดโรคนับจากชั่วโมงที่ 0 จนถึงกุ้งเริ่มตาย พบว่าช่วงแรกของขั้นตอนการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสจะเกิดขึ้นในนิวเคลียส แต่การรวมตัวเป็นอนุภาคสมบูรณ์จะเกิดขึ้นใน cytoplasm หลังจากได้รับเชื้อไวรัสได้ประมาณ 32 ชั่วโมง การเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสจะเกิดขึ้นใน cytoplasm เป็นส่วนใหญ่ ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลายอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้กุ้งกุลาดำตายภายใน 48 - 56 ชั่วโมง ภายหลังได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ปี 1995 Chou et al. ได้ศึกษาการแพร่ระบาดของโรคอย่างรุนแรงในกุ้งเพาะเลี้ยงวงศ์ penaeid หลายชนิดในประเทศไต้หวัน รวมทั้งกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กุ้งกุลูมา *Penaeus japonicus* และกุ้งหางแดง *Penaeus penicillatus* พบว่ากุ้งที่เป็นโรคเหล่านี้จะมีอาการให้เห็นคือ เป็นดวงขาวบนแผ่นก้ามหรือหัวอก (carapace) บนระยางค์ (appendage) และที่ผิวลำตัว ลักษณะอาการนี้เรียกว่า white spot syndrome (wss) กุ้งกุลูมา *Penaeus japonicus* ปกติ จะแสดงอาการดวงขาวเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำที่กรองได้จากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลูมา *Penaeus japonicus* และกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่เป็นโรค กุ้งที่เป็นโรคนี้จะมีอัตราการ

ตายสะสมเป็น 100% ภายใน 5-7 วัน โดยมีผลมาจากความเครียดจากการจับและอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงร่วมด้วย เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคของไวรัสมีรูปร่างเป็นท่อน (non-occluded rod shaped viral particle) อยู่ที่ผิวหนัง (epidermis) ของกุ้งクルマที่ได้รับเชื้อเองตามธรรมชาติและจากการให้ได้รับเชื้อในห้องทดลอง อนุภาคของ virion เหล่านี้มี envelope หุ้ม มีความยาว 330 ± 20 nm และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 87 ± 7 nm ลักษณะอาการที่ปรากฏภายนอกและสัณฐานวิทยาของไวรัส มีความคล้ายคลึงกันทั้งในกุ้งที่ได้รับเชื้อเองตามธรรมชาติและกุ้งที่ได้รับเชื้อในห้องทดลอง ซึ่งข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าไวรัสรูปท่อนชนิดนี้อาจจะเป็นสาเหตุหลักของการที่กุ้งเป็นโรค white spot syndrome ในได้หวั่น

ในปี 1997 Tapay et al. ได้ทำการแยก chinese baculovirus-like virus (CBV) จาก cephalothorax ของกุ้งクルマ *Penaeus japonicus* ที่เป็นโรคจากประเทศจีน โดยบด cephalothorax ใน antibiotic incubation medium (AIM) ซึ่งประกอบด้วย penicillin, streptomycin และ amphotericin นำไปปั่นหมุนเหวี่ยง แล้วนำส่วนใสมากรองผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด $0.2 \mu\text{m}$ นำไวรัสที่เตรียมได้มาฉีดเข้ากล้ามเนื้อของกุ้ง *Penaeus stylirostris* และ *Penaeus vannamei* ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 4-20 กรัม ปริมาตร 0.1-0.2 ml ต่อตัว ขณะที่กุ้งกลุ่มควบคุมเป็นกุ้งปกติที่ไม่ได้รับเชื้อมาก่อนโดยฉีดด้วย TNE buffer (pH 7.4) เลี้ยงกุ้งทดลองที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทุกวัน บันทึกจำนวนกุ้งที่ตาย ส่วนกุ้งที่กำลังจะตายจะถูกแยกออกจากอ่างเลี้ยงและนำมาศึกษาทาง histopathology พบว่า กุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ที่ได้รับเชื้อ CBV จะเริ่มตายภายใน 2 วัน และตายลงทั้งหมดในเวลา 4 วัน อัตราการตายสะสมของกุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ที่เวลา 2 วัน หลังจากได้รับเชื้อคือ 14% สำหรับ white shrimp และ 17% สำหรับ blue shrimp ส่วนอัตราการตายสะสมของกุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ที่เวลา 3 วัน หลังจากได้รับเชื้อคือ 57% สำหรับ white shrimp และ 73% สำหรับ blue shrimp ขณะที่เวลา 4 วัน หลังจากได้รับเชื้อ กุ้งทั้ง 2 สปีชีส์จะตายลงทั้งหมดคือ 100% ส่วนกุ้งกลุ่มควบคุมไม่พบการตายและจากการศึกษาทางด้าน histopathology โดยนำเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งที่ได้รับเชื้อ และกุ้งกลุ่มควบคุมมา fix ใน Davidson's fixative และผ่านกระบวนการต่าง ๆ แล้วตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ากุ้งทั้ง 2 สปีชีส์ แสดงอาการตายของเนื้อเยื่อคล้าย ๆ กัน โดยพบใน loose connective tissue ทุกบริเวณ cuticular epidermis อวัยวะน้ำเหลือง และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด Antennal gland ของกุ้งที่ได้รับเชื้อ CBV จะปรากฏอาการ necrosis ลักษณะของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ CBV จะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ เมื่อนำชิ้นส่วนของเหงือก

ดับ และดับอ่อนของกุ้งตัวอย่างที่ได้รับเชื้อ CBV และกุ้งกลุ่มควบคุมมา fix ด้วย 3% glutaraldehyde ใน 0.05 M cacodylate buffer (pH 7.0) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง นำตัวอย่างไป fix อีกครั้งใน 1.33-1.5% osmium tetroxide แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า CBV ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งมีรูปร่างเป็นแท่ง นิวเคลียสของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ CBV มีการขยายตัว อนุภาคของไวรัสมี envelope หลายชั้น มีความยาวเฉลี่ย 265 ± 20 nm และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 120 ± 10 nm (จำนวนตัวอย่าง 20 ตัว) ความยาวของ nucleocapsid 205 ± 12 nm และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 78 ± 5 nm ช่องว่างระหว่าง envelope และ nucleocapsid ยาว 12 ± 2 nm ส่วนดับและดับอ่อนของกุ้งที่ได้รับเชื้อไม่ปรากฏอาการเช่นที่พบในเนื้อเยื่อเหงือกเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

Nunan, Poulos and Lightner. (1998) ได้รายงานการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและไวรัสหัวเหลืองในกุ้งที่นำเข้าจากต่างประเทศ จากประเทศต่าง ๆ แถบเอเชีย โดยการตรวจวินิจฉัยทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และเทคนิค PCR ด้วยการนำกุ้งแช่แข็งที่ซื้อมาจากแหล่งต่าง ๆ รวบรวม carapace ที่มีลักษณะเป็นจุดดวงขาวและสีแดง ซึ่งแสดงอาการของโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ สำหรับกุ้งแช่แข็งที่เป็นชนิดหลักในการทดลองคือกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กุ้ง *Penaeus californiensis* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กุ้งที่ใช้เป็นตัวทดสอบให้เชื้อไวรัสในครั้งนี้คือ *Penaeus stylirostris* ในระยะ post larva (PL) และวัยรุ่น (juvenile) น้ำหนักเฉลี่ย 5 g ส่วนการเตรียมไวรัส โดยการเก็บหางของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* แช่แข็งที่แสดงอาการตัวแดงดวงขาวที่ซื้อมาจากตลาดใน Arizona ปี 1995 ตัดขาเดินออกแล้วบดใน TN buffer (0.02 M Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสเจือจาง 1 : 10 ด้วย 2% NaCl และกรองผ่าน 0.2 μ m filter ฉีดไวรัสที่เตรียมได้เข้าไปในกล้ามเนื้อของกุ้ง *Penaeus stylirostris* ปริมาตร 0.2 ml ต่อตัว จำนวนกุ้งทั้งหมด 15 ตัว นำกุ้ง *Penaeus stylirostris* 2 ตัวที่ป่วยจากทั้งหมด 15 ตัว fix ใน Davidson's AFA fixative เพื่อศึกษาทาง histopathology ผ่านกระบวนการต่าง ๆ และ embed ใน paraplast plus paraffin ตัด section ความหนา 4 μ m แล้วย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin เพื่อศึกษา histopathology ด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง พบว่ากุ้ง *Penaeus stylirostris* ที่ฉีดไวรัสมีอัตราการตายเป็น 100% ภายใน 8 วัน หลังจากการฉีด กุ้ง 2 ตัว ที่ป่วยนั้นพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งแสดงลักษณะ necrosis prominent nuclear karyorhexis และ pyknosis เนื้อเยื่อที่ได้รับผลกระทบจากไวรัสคือ อยัวะน้ำเหลือง อยัวะสร้างเม็ดเลือด pillar cell และ epithelial

cell ของเหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพันใน subcutis กล้ามเนื้อ ทางเดินอาหาร antennal gland, gonad เส้นประสาท (nerve tract) และปมประสาท (ganglia) เมื่อศึกษาด้วย TEM พบว่าอนุภาคของไวรัสมีขนาดใหญ่ ลักษณะคล้ายคลึงกับไวรัสหัวเหลืองที่พบในตะกอนของ haemolymph ที่ได้จากกุ้งปวย (*Penaeus stylirostris*) อนุภาคของไวรัสมีหนามเป็นปุ่มปมยื่นออกมาจาก envelope อนุภาคของไวรัสขนาดใหญ่วัดได้ความยาว 155 – 210 nm (เฉลี่ย 170 nm) เส้นผ่านศูนย์กลาง 26 – 54 nm (เฉลี่ย 38 nm) ส่วนอนุภาคขนาดเล็ก ยาว 53 – 97 nm (เฉลี่ย 71 nm) เส้นผ่านศูนย์กลาง 22 – 47 nm (เฉลี่ย 30 nm) ส่วนผลการศึกษาด้วยเทคนิค PCR แสดงให้เห็นว่า ในเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ใช้เตรียมไวรัสในการทำกุ้ง *Penaeus stylirostris* ติดเชื้อ มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ผลจากการศึกษานี้บ่งชี้ว่า เชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับกุ้งสามารถที่จะถ่ายทอดผ่านทางผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งที่นำเข้าได้

Kasornchandra et al. (2000) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) จากพ่อแม่กุ้งกุลาดำโดยตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างพ่อแม่กุ้ง และลูกกุ้งระยะต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะฟัก ด้วยวิธี PCR *in situ* hybridization และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบ่งพ่อแม่กุ้งที่ผ่านการตรวจเชื้อไวรัส SEMBV ออกเป็น 5 กลุ่ม โดยให้กุ้งทดลองแต่ละกลุ่มกินเนื้อปูติดเชื้อไวรัสวันละ 1 มื้อ ติดต่อกันเป็นเวลา 2 3 4 และ 5 วัน ตามลำดับ ส่วนกุ้งกลุ่มควบคุมให้กินเนื้อปูปกติที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส SEMBV ในแม่กุ้งก่อนวางไข่ 1 วัน ด้วย one-step PCR และ two-step PCR ปรากฏว่าแม่กุ้งที่กินเนื้อปู 2 วันให้ผลบวก เมื่อตรวจด้วยวิธี two-step PCR ในขณะที่แม่กุ้งที่ให้กินเนื้อปูติดต่อกันเป็นเวลา 3 4 และ 5 วัน ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วย one-step PCR และจากการตรวจยืนยันผลการติดเชื้อไวรัส SEMBV ในแม่กุ้งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและวิธี *in situ* hybridization พบเชื้อไวรัส SEMBV ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน follicle cell และเซลล์ไข่อ่อน (perinucleolus oocyte) และไข่ที่กำลังพัฒนา (yolkly oocyte) จากนั้นนำไข่กุ้งที่รวบรวมได้ไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนประมาณ 3-4 ครั้ง แล้วจึงย้ายไปลงถังฟัก อนุบาลลูกกุ้งต่อไปจนได้ลูกกุ้งระยะ post larva ในระหว่างการอนุบาลเก็บตัวอย่างลูกกุ้งระยะต่าง ๆ คือ nauplius, zoea, mysis และ post larva เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส SEMBV ด้วยวิธี PCR และ *in situ* hybridization ปรากฏว่าลูกกุ้งระยะ nauplius และ zoea ที่ได้จากแม่กุ้งที่ติดเชื้อไวรัส SEMBV เพียงเล็กน้อย ให้ผลเป็นบวกกับวิธี two-step PCR สำหรับลูกกุ้งกลุ่มที่เหลือทั้งหมดให้ผลบวกกับวิธี one-step PCR ส่วนแม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกัน 4 วัน ไข่กุ้งไม่ฟักเป็น nauplius ขณะที่แม่กุ้งที่กินเนื้อปูติดต่อกัน 5 วัน ไข่กุ้งจะฝ่อ เนื่องจากไข่กุ้งดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาต่อเป็นไข่

สมบูรณ์ได้ สำหรับการตรวจด้วยวิธี *in situ* hybridization พบเชื้อไวรัส SEMBV ในลูกกุ้งระยะ mysis และ post larva จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่เชื้อไวรัส SEMBV สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่กุ้งสู่ลูกกุ้งกุลาดำ (vertical transmission) โดยเชื้อไวรัสจะเกาะติดที่ผิวไข่สำหรับไข่อ่อนและไข่ที่กำลังพัฒนา เชื้อไวรัสจะเข้าสู่นิวเคลียสและเพิ่มจำนวนอนุภาค ทำให้ไข่กุ้งไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ เฉพาะไข่ที่พัฒนาเป็นไข่แก่แล้ว และมีเชื้อไวรัสเกาะอยู่ที่ผิวไข่เท่านั้น จะฟักเป็น nauplius ที่ติดเชื้อไวรัส SEMBV

Flegel and Fegan. (1993) ได้รายงานว่าโรคหัวเหลืองนี้ยังไม่มีสารเคมีหรือยาใด ๆ รักษาได้ วิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่สุด เช่น ไม่ควรใช้อาหารสดในการเลี้ยงกุ้ง และงดการใช้อุปกรณ์ร่วมกันในบ่อเลี้ยง เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อ รวมทั้งการจัดสิ่งแวดล้อมที่ดีในระหว่างการเลี้ยงด้วย ส่วนความพยายามที่จะป้องกัน และควบคุมการระบาดของโรคที่เกิดจากไวรัสหัวเหลือง ทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยกุ้งที่ติดเชื้อ โดยตรวจวินิจฉัย พ่อ-แม่พันธุ์ และ ลูกกุ้งวัยอ่อน ก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์มโดยวิธี RT-PCR ซึ่ง Wongteerasupaya et al. (1997) ได้ใช้ในการตรวจสอบจับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสหัวเหลือง วิธีนี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสให้ได้จำนวนมาก ทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ แม้จะมีปริมาณน้อยในระยะแรก วิธีการนี้จะช่วยให้ตรวจวินิจฉัยได้เร็ว โดยการสกัด sRNA จากกุ้งกุลาดำที่ทำให้ติดเชื้อด้วยไวรัสหัวเหลือง พบว่าสามารถตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองได้ถึง 0.01 pg และสามารถตรวจหาไวรัสหัวเหลืองได้หลังจากที่ได้รับเชื้อแล้วภายใน 6 – 12 ชั่วโมง เป็นการชี้ให้เห็นว่า RT-PCR ใช้ตรวจสอบในระยะแรกก่อนที่ไวรัสหัวเหลืองจะระบาด ถึงแม้ว่า RT-PCR จะเป็นเทคนิคที่ปัจจุบันได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่มีข้อจำกัดในทางปฏิบัติ ได้แก่ต้องการอุปกรณ์พิเศษและบุคลากรที่มีความชำนาญสูง นอกจากนี้ค่าตรวจวิเคราะห์ราคาสูงอีกด้วย

เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้มีการนำมาใช้ในการแพทย์และการเกษตร เพื่อวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสได้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและแม่นยำสูง วิธีการสามารถทำได้ง่าย ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญหรือได้รับการฝึกฝนเป็นพิเศษ ตัวอย่างเช่นการตรวจสอบการตั้งครรภ์ โดยการตรวจหา HCG (human chorionic gonadotropin) ในน้ำปัสสาวะ

มีรายงานความพยายามจากนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มในการใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันเพื่อใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส โดยการผลิตแอนติซีรั่มที่มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง (Lu, Tapay and Loh. 1996 ; Nadala et al. 1997)

โดย Nadala et al. (1997) ได้พัฒนาวิธี Western blot เพื่อตรวจหาไวรัสหัวเหลืองและ CBV (chinese baculovirus) หรือที่เรียกกันว่า WSSV เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเหล่านี้ ด้วยการฉีดกึ่ง *Penaeus vannamei* ด้วยส่วนที่สกัดมาจากเนื้อเยื่อส่วนหัว (head soft tissue) ของกุ้งที่ติดเชื้อแล้วมาตรวจหาไวรัสหัวเหลือง และ CBV ด้วยวิธี Western blot สามารถพบเชื้อไวรัสหัวเหลือง หลังจากทำให้ติดเชื้อแล้ว 64 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ CBV พบในเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากทำให้ติดเชื้อ ส่วนการตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองในอวัยวะน้ำเหลือง ที่เพาะเลี้ยงนั้นสามารถตรวจสอบได้ภายใน 4 วันหลังจากทำให้ติดเชื้อแล้ว CBV ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือทำได้ยาก ความไวต่ำ ไม่สามารถใช้นอกห้องปฏิบัติการได้

ถึงแม้จะมีการพัฒนาวิธีที่ง่ายขึ้นในการตรวจหากุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays (DB-NC-EIA) โดยนำเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้ง *Penaeus vannamei* ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 40 – 60 กรัม มาบดใน phosphate buffered saline (PBS , pH 7.4) นำเนื้อเยื่อเหงือกที่บดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วไปตรวจหาไวรัสโดยใช้เทคนิค DB-NC-EIA นอกจากนี้ยังนำ WSSV หรือ WSV isolate ต่าง ๆ ที่แยกได้จากกุ้งชนิดต่าง ๆ มาตรวจโดยใช้เทคนิคนี้ด้วย ได้แก่ WSV ที่แยกได้จากกุ้ง *Penaeus vannamei* ในประเทศจีน อินโดนีเซีย สหรัฐอเมริกา และจากกุ้งクルマ *Penaeus japonicus* จากประเทศญี่ปุ่น การตรวจหา WSV และไวรัสหัวเหลือง ด้วยการนำตัวอย่างที่บดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วมาหยดลงบน nitrocellulose (NC) membrane ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหยด นำไปบ่มใน blocking solution (5% nonfat dry milk / PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วย้าย membrane ไปบ่มใน rabbit anti-WSV IgG-HRP (1 : 250 ใน 1% nonfat dry milk / PBS) ส่วน membrane อีกแผ่นหนึ่งย้ายไปบ่มใน rabbit anti-YHV IgG-HRP (1 : 500 ใน 1% nonfat dry milk / PBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วล้าง membrane 3 ครั้ง ๆ ละ 50 นาทีด้วย PBS – T (0.05% Tween – 20/ PBS) หลังจากนั้นเติม substrate TMB (3, 3', 5, 5' – tetramethylbenzidine) ปลอ่ยให้ทำปฏิกิริยากับ substrate เป็นเวลา 3 นาที หยุดปฏิกิริยาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทำให้เห็นตรงจุด

ผลที่เกิดขึ้น พบว่าอัตราการเจอจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการตรวจหา WSV โดยใช้ anti-WSV IgG-HRP คือ 1 : 250 ขณะที่อัตราการเจอจางที่เหมาะสมของแอนติบอดีในการตรวจหาไวรัสหัวเหลืองโดยใช้ anti-YHV IgG-HRP คือ 1 : 500 และการใช้เทคนิค DB-NC-EIA สามารถตรวจหา WSV และไวรัสหัวเหลือง ในสารสกัดหยาบของตัวอย่างกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่ได้รับเชื้อไวรัสได้เป็นอย่างดีแม้ว่าจะมีอัตราการเจอจางเป็น 1 : 10 ในทาง ตรงกันข้ามไม่พบ WSV และไวรัสหัวเหลือง ในตัวอย่างสารสกัดหยาบของกุ้งปกติที่ไม่ได้รับเชื้อเมื่อตรวจหาด้วยวิธีการเดียวกัน แต่วิธีนี้ความไวในการตรวจก็ยังต่ำมาก (Nadala and Loh. 2000)

ในปี 2000 Sithigorngul et al. สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองได้สำเร็จจากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดจากเหงือกของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง และ WSSV คือ แอนติบอดี V3-2B ซึ่งเป็นโคลนที่มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองสามารถจับกับไวรัสหัวเหลืองได้ทั้ง native antigen และ SDS-treated viral specific antigen จากการศึกษาเหงือกกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสด้วยวิธี immunocytochemistry พบว่าไวรัสกระจายอยู่ใน cytoplasm ของเนื้อเยื่อเหงือก และเซลล์ตับ (hepatocyte) และไม่พบการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนในเลือดกุ้งปกติ ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาด้วยวิธี immunocytochemistry ของเนื้อเยื่อกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่าให้ผลบวกกับปฏิกิริยาดังกล่าว ขณะที่เนื้อเยื่อของกุ้งกลุ่มควบคุมหรือกุ้งปกติจะไม่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยานี้ และจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot พบว่าแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 kDa ซึ่งโปรตีนชนิดนี้พบเฉพาะในกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่านั้น ส่วนการศึกษาด้วยเทคนิค Dot blot indirect immunoperoxidase assay พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองที่อยู่ในเลือดที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้ถึงอัตราการเจอจางเป็น 1 : 1000 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งอย่างรุนแรง และไม่รุนแรงอย่างได้ผลต่อไป

การศึกษาที่เกี่ยวกับพาหะของโรคไวรัสหัวเหลือง

การกำจัดป้องกันสัตว์ต่าง ๆ ที่เชื่อว่าเป็นพาหะของไวรัสก่อนปล่อยลูกกุ้งลงบ่อเลี้ยง เป็นวิธีในการป้องกันโรคหัวเหลืองได้อีกวิธีหนึ่ง (Flegel and Fegan. 1993) ดังนั้นการตรวจ

วินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์เหล่านี้เข้ามาสู่ในระบบการเลี้ยงกุ้ง

การศึกษาถึงความเป็นพาหะในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ส่วนใหญ่มีรายงานเฉพาะเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดย Lo et al. (1996) ได้รายงานการตรวจพบไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (WSBV) ในกุ้งหลายชนิดในประเทศต่าง ๆ ของทวีปเอเชียด้วยวิธี 1-step PCR reaction และได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาวความไวสูงคือวิธี 2-step PCR ซึ่งความไวของการตรวจวินิจฉัยโดยใช้ 2-step PCR สูงกว่า 1-step PCR ประมาณ $10^3 - 10^4$ เท่าจากการใช้เทคนิค 1-step PCR และ 2-step PCR ทำให้สามารถตรวจหา DNA ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งที่เพาะเลี้ยงรวมทั้งกุ้ง ปู และ อาร์โทรพอด (arthropod) อื่น ๆ ที่จับได้จากธรรมชาติอีกด้วย จากการตรวจหา DNA ของ ไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งที่เพาะเลี้ยงได้แก่ กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กุ้งกุลูมา *Penaeus japonicus* กุ้งหางแดง *Penaeus penicillatus* และกุ้งตะกาด (sand shrimp) *Metapenaeus ensis* พบว่ากุ้งเหล่านี้มีอาการตัวแดงดวงขาว เมื่อตรวจวิเคราะห์ DNA ที่สกัดได้จากกุ้งที่เก็บรวบรวมได้ด้วยวิธี 1-step PCR amplification พบว่าให้ 1447 bp PCR product นอกจากนี้ยังพบว่าปูทะเล *Scylla serrata* ที่เพาะเลี้ยงได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี 1 - step PCR ขณะที่ตัวอย่างอื่น ๆ จะให้ผลบวกเมื่อตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 2-step PCR เท่านั้น การตรวจหา WSBV specific DNA fragment ของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ด้วยวิธี 2-Step PCR amplification พบว่ากุ้งชนิดนี้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย นอกจากนี้จากผลการทดลองที่ได้ยืนยันได้ว่า กุ้งที่จับได้จากธรรมชาติ ได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งกุลูมา กุ้ง *Penaeus semiculatus* กุ้งหางแดง *Penaeus penicillatus* ปูกางเขน *Charybdis feriatus* ปูม้า *Portunus pelagicus* และปูสามจุด *Portunus sanguinolentus* ซึ่งรวบรวมได้จากชายฝั่งทางใต้ของประเทศไต้หวันได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย และจากการตรวจหา ไวรัสตัวแดงดวงขาวใน arthropod ซึ่งรวบรวมได้จากฟาร์มกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ปรากฏว่าไรน้ำกลุ่ม copepod *Helice tridens* กุ้งในวงศ์ Palaemonidae ชนิดต่าง ๆ และ ตัวอ่อนของแมลงในวงศ์ Ephydriidae ซึ่งคาดว่าจะเป็นแหล่งสะสมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวให้กุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงได้

ในปี 1998 Kanchanaphum et al. ได้ศึกษาปู 3 ชนิดที่คาดว่าจะเป็พาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้แก่ ปูแสม *Sesarma sp.* ปูทะเล *Scylla serrata* และปูก้ามดาบ *Uca*

pugilator ปูเหล่านี้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดเชื้อเข้าไป แต่ยังไม่แสดงอาการ และไม่มีการตายเกิดขึ้นตลอดช่วง 45 วันของการทดลอง เมื่อตรวจวินิจฉัยทางเนื้อเยื่อด้วยวิธี *in situ* hybridization และ PCR amplification พบว่ามีไวรัสแฝงตัวอยู่จำนวนมาก ปูทุกชนิดที่เป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวนี้สามารถถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งกุลาดำได้ โดยผ่านทางน้ำที่อยู่ในบ่อเพาะเลี้ยงหรือที่กักขังสัตว์น้ำ ซึ่งมีการเลี้ยงทั้งกุ้งและปูร่วมกัน การถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งตรวจพบได้ด้วยวิธี *in situ* hybridization และเทคนิค PCR หลังจากให้ปูกับกุ้งอยู่ร่วมกันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แต่เมื่อให้กุ้งและปูก้ามดาบอยู่ร่วมกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวได้โดยใช้ PCR amplification และหลังจากการอยู่ร่วมกัน 60 ชั่วโมงจะตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้วิธี *in situ* hybridization ขณะที่ปูทะเล *Scylla serrata* เมื่ออยู่ร่วมกับกุ้งพบว่า จะมีการถ่ายทอดไวรัสไปยังกุ้งหลังจากที่อยู่ร่วมกันเป็นเวลา 36 ชั่วโมงเมื่อตรวจโดยใช้ PCR และพบที่ 60 ชั่วโมงด้วยวิธี *in situ* hybridization ส่วนปูแสม *Sersama sp.* เมื่อเลี้ยงรวมกับกุ้งกุลาดำจะตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวหลังจาก 48 ชั่วโมง ซึ่งตรวจด้วยวิธี PCR และ 72 ชั่วโมงเมื่อตรวจโดยใช้ *in situ* hybridization จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าปูสามารถเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาวได้

Supamattaya et al. (1998) ได้ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่เป็นโรคตัวแดงดวงขาวไปยังครัสตาเซียน 3 ชนิดที่มักพบเป็นประจำในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้แก่ ปูม้า *Portunus pelagicus* ปูทะเล *Scylla serrata* และกุ้งเคย *Acetes sp.* ด้วยการเตรียมสารสกัดจากเหงือก โดยนำเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมาบดใน lobster haemolymph medium (LHM) pH 7.4 อัตราส่วนเนื้อเยื่อต่อ LHM เท่ากับ 1 : 10 ปั่นแยกตะกอนทิ้งที่ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมากรองผ่าน membrane ปลอดเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูขนาด 0.22 μm ย้อมสีแบบ negative staining ด้วย phosphotungstic acid ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สารสกัดที่ได้จะนำไปฉีดและจุ่ม (immersion) สัตว์ทดลอง โดยให้กุ้งเคยได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีด การจุ่ม และการกินเนื้อของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคเข้าไปในเวลาต่าง ๆ กัน ส่วนปูทั้ง 2 ชนิดทำให้ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยการฉีดและการกินเท่านั้น ตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของครัสตาเซียนทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธีการทาง histology กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และ *in situ* hybridization โดยใช้เนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำปกติที่ไม่ติดเชื้อและเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็น negative control

และ positive control ตามลำดับ พบว่ากุ้งเคยมีลำตัวสีแดงภายใน 24 – 48 ชั่วโมง หลังจากฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และการให้ได้รับเชื้อโดยการฉีดจะให้ผลดีที่สุดคือ อัตราการตายเป็น 100 % ภายใน 3 วัน รองลงมาคือการจุ่มกุ้งเคยในสารสกัดจากเนื้อเยื่อเหงือกของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคซึ่งจะมีการตายทั้งหมดภายในเวลา 5 วัน และการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคจะทำให้กุ้งเคยตายลง 20 % ภายในเวลา 9 วัน ส่วนปูทั้ง 2 ชนิด การฉีดจะให้ผลดีที่สุด โดยที่การฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวให้ปูม้าจะทำให้ปูม้าตายทั้งหมดภายในเวลา 8 วัน ขณะที่ปูทะเลตายลงเพียง 20 % เท่านั้นภายในเวลา 9 วัน การให้ปูทั้งสองชนิดกินเนื้อของกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ปูทั้งสองชนิดยังสามารถดำรงชีวิตได้มากกว่า 9 วัน จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการที่สัตว์ทดลองได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ก็ไม่จำเป็นที่สัตว์ทดลองนั้นจะต้องตายทั้งหมด จึงเป็นไปได้ว่ากุ้งเคยและปูทั้ง 2 ชนิดเป็นแหล่งพาหะของไวรัส ซึ่งนำเชื้อไวรัสจากบ่อหนึ่งไปยังอีกบ่อหนึ่งได้และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งได้เป็นเวลานาน จากผลการศึกษาทาง histology ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า เซลล์เม็ดเลือด เซลล์เหงือก และเซลล์เยื่อบุผิวของกุ้งเคยที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ ลักษณะเช่นนี้ก็พบในปูทั้ง 2 ชนิดที่ได้รับเชื้อไวรัสด้วยเช่นกัน เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าอนุภาคของไวรัสชนิดนี้มีรูปร่างเป็นท่อนเช่นเดียวกับที่พบในกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคและมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในเนื้อเยื่อโดยใช้ *in situ* hybridization โดยใช้ probe ขนาด 4.2 กิโลเบสที่ติดฉลากด้วย digoxigenin ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่า เซลล์ของเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองทั้ง 3 ชนิดที่มีนิวเคลียสขยายใหญ่ให้ผลบวกกับ *in situ* hybridization ในทางตรงกันข้าม เซลล์ของเนื้อเยื่อกุ้งและปูปกติไม่ให้ผลบวกกับปฏิกิริยานี้

Chen et al. (2000) ได้ตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวใน benthic larvae ของปูทะเล *Scylla serrata* ซึ่งจับได้จากบริเวณชายฝั่งทางตอนใต้ของประเทศไต้หวันโดยใช้เทคนิค PCR และ *in situ* hybridization พบว่าตัวอ่อนของปูทะเลประมาณ 60 % มีไวรัสตัวแดงดวงขาวแฝงอยู่ แม้ว่าจะย้ายตัวอ่อนเหล่านี้ไปเลี้ยงในบ่อเลี้ยงที่มีการให้อากาศในห้องปฏิบัติการก็ยังคงตรวจพบไวรัสตัวแดงดวงขาวอีกเช่นเดิม จากการนำตัวอ่อนของปูทะเลจำนวน 180 ตัวที่ฟักออกจากไข่ซึ่งปราศจากไวรัสตัวแดงดวงขาวไปแช่ในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือจาง 1 : 50 ปนอยู่ ซึ่งน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือปนอยู่นี้เตรียมได้จากแผ่นแก้วปิดเหงือก

และเปลือกหุ้มลำตัว (integument) น้ำหนักประมาณ 5 กรัม จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรง (ให้ผลบวกกับ 1-step PCR) นำแผ่นแก้วปิดเหงือกและเปลือกหุ้มลำตัวมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วบดให้เป็นเนื้อเดียวกันในน้ำทะเลปลอดเชื้อปริมาตร 40 ml นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนใสผ่านกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.45 μm ส่วนตัวอ่อนของปูทะเลกลุ่มควบคุมจำนวน 260 ตัว ทำเหมือนกันแต่ใช้น้ำทะเลปลอดเชื้อแทน (blank inoculation) หลังจากนำสัตว์ทดลองแช่ในน้ำตัวอย่างที่เตรียมไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้ออีก 2 ครั้ง แบ่งสัตว์ทดลองแต่ละชุดออกเป็น 3 กลุ่มย่อย แต่ละกลุ่มเลี้ยงในอ่างพลาสติกที่มีการให้อากาศ อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 15 วัน บันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายลงในแต่ละกลุ่ม และเก็บออกจากอ่างเพาะเลี้ยง สัตว์ทดลองที่ตายทั้งหมดจะถูกนำมาตรวจวินิจฉัยว่าได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวหรือไม่ โดยสกัด DNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของสัตว์ทดลองและตรวจวิเคราะห์โดยใช้ 2-step PCR และ *in situ* hybridization รวมทั้งย้อมสี hematoxylin และสี eosin ร่วมกัน พบว่าตัวอ่อนของปูทะเลที่แช่ในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือปนอยู่จะมีอัตราการตายสะสมสูงถึง 43 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายสะสมเพียง 20 % เท่านั้น จากการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค PCR ทั้งในปูที่ใกล้จะตายและปูที่ยังมีชีวิตอยู่ ชี้ว่าไวรัสชนิดนี้เป็นสาเหตุของการตายของตัวอ่อนของปูทะเลมากที่สุด และจากการคัดเลือกตัวอย่างปูที่แช่ในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวปนอยู่เป็นเวลา 2 ชั่วโมงมาเลี้ยงในสภาวะปกติที่เวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมงและ 2 4 6 8 10 และ 12 วัน สุ่มเลือกปูซึ่งใกล้จะตายจากตัวอย่างปูแต่ละกลุ่ม นำมา fix ใน Davidson's fixative เวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาตัดเนื้อเยื่อและผ่านกระบวนการต่าง ๆ เพื่อรักษาทาง histology และย้อมด้วยสี hematoxylin และสี eosin นอกจากนี้ยังนำเยื่อเยื่อที่เตรียมได้มา hybridize กับ DNA probe เพื่อตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค *in situ* hybridization โดย DNA probe นี้จะติดฉลากด้วย digoxigenin - NTP โดยวิธี random priming method พบว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวที่พบในตัวอ่อนของปูทะเล *Scylla serrata* จะพบที่เนื้อเยื่อของอวัยวะเหมือนกับที่พบในกุ้งทั่ว ๆ ไปคืออวัยวะภายนอก เช่น เหงือก เปลือกหุ้มลำตัว และเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะสลายตัว นอกจากนี้ยังพบ

ไวรัสตัวแดงดวงขาวในอวัยวะภายในอื่น ๆ ได้แก่ กระเพาะอาหาร ตับและตับอ่อน หัวใจและเนื้อเยื่อประสาทโดยเฉพาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเนื้อเยื่อบุผิวของอวัยวะเหล่านั้น

จะเห็นได้ว่าการศึกษาส่วใหญ่ทำในไวรัสตัวแดงดวงขาว เนื่องจากไวรัสนี้มีสารพันธุกรรมเป็น DNA จึงศึกษาได้ง่ายกว่าไวรัสหัวเหลือง ส่วนการศึกษาในไวรัสหัวเหลือง Flegel et al. (1995) ได้รายงานว่ NICA (National Institute for Coastal Aquaculture) ได้ทดลองการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ด้วยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้กุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguensis* และกุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* ได้ และเมื่อฉีดสารสกัดจากกุ้งเคย *Acetes* sp. จากบ่อเลี้ยงกุ้งที่เกิดโรค สามารถก่อให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้ Flegel et al. (1995) ยังรายงานว่ SCRC (Charoen Pokphand Shrimp Culture Research Center) ได้ศึกษาในกุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* ที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการกินกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ สามารถมีชีวิตอยู่ได้ และสามารถถ่ายทอดการติดเชื้อให้กุ้งกุลาดำโดยการกินกุ้งเหล่านี้

จากความสำเร็จในการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสหัวเหลืองและสามารถใช้แอนติบอดีนี้ตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี immunocytochemistry ได้อย่างสะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อยมาก และผลที่ได้แน่นอน ทำให้การศึกษากการติดเชื้อในสัตว์ที่คาดว่าอาจเป็นพาหะ ทำได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้นกุ้งชนิดต่าง ๆ ของวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae ที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงอาจเป็นพาหะที่สามารถแพร่เชื้อไวรัสหัวเหลืองสู่กุ้งกุลาดำได้เช่นกัน จึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษาอย่างยิ่ง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

กุ้งทดลองที่ใช้เป็นกุ้งชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae

กุ้งในวงศ์ Palaemonidae เช่น กุ้งกะต๋อม น้ำหนักประมาณ 2.65 - 5.75 กรัม
กุ้งฝอย น้ำหนักประมาณ 0.22 - 1.00 กรัม กุ้งก้ามกราม น้ำหนักประมาณ 12.39 - 25.27
กรัม กุ้งกะเปาะ น้ำหนักประมาณ 1.30 - 3.88 กรัม และกุ้งฝอยน้ำเค็ม น้ำหนักประมาณ
0.11 - 0.28 กรัม

กุ้งในวงศ์ Penaeidae เช่น กุ้งตะกาด น้ำหนักประมาณ 2.57 - 10.10 กรัม

กุ้งในวงศ์ Atyidae เช่น กุ้งกะปิ

อุปกรณ์ และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. จานแก้ว (petridish)
3. ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
4. เครื่องปั๊มดูดอากาศ (suction pump)
5. สไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์
6. โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (couplin jar)
7. ตะกร้าสำหรับย้อมสไลด์ (slide basket)
8. ไมโครปิเปต (micropipette) พร้อมทิป
9. ขวดแก้วปากตรง (vial)
10. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) LEICA RM 2135
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. ตู้อบ (hot air oven)

13. ตู้ดูดควัน (chemical fume hood)
14. แท่นอุ่นสไลด์ (slide warmer)
15. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope)
16. กล้องและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

สารเคมี

1. เอทิลแอลกอฮอล์ 70 % , 80% , 90% และ 95%
2. นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alccohol)
3. ไซลีน (xylene)
4. พาราพลาสต์ พลัส พาราฟิน (paraplast plus paraffin)
5. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
6. Davidson's fixative (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
7. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate bufferd saline, PBS) 0.15 โมลาร์
pH 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
8. สารละลาย P₁⁺ (calf bovine serum : PBS dilution 1:10) วิธีเตรียมดูภาคผนวก
9. ไดอะมีโนเบนซีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidine tetrahydrochloride,
DAB)
10. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30%
11. สี eosin 0.02 % ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
12. สี hematoxylin (วิธีเตรียมดูภาคผนวก)
13. แอนติบอดีสำหรับตรวจไวรัสหัวเหลี่ยม
แอนติบอดีตัวแรก (first antibody) ที่ใช้คือ
โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ซึ่งจำเพาะต่อ envelope protein ของไวรัส ขนาด
135 kDa
โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D ซึ่งจำเพาะต่อ capsid protein ของไวรัส ขนาด
67 kDa และ
โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ซึ่งจำเพาะต่อ matrix protein ของไวรัส ขนาด 22
kDa

แอนติบอดีตัวที่สอง (second antibody) ที่ใช้คือ Goat anti-mouse IgG H and L chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) Biorad

14. เชื้อไวรัสหัวเหลือง (วิธีเตรียมคุณภาพคนวก)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างกุ้ง

เก็บตัวอย่างกุ้งชนิดต่าง ๆ จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอยะรังบุรี จังหวัดสมุทรสาคร อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ อำเภอเมือง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เช่น กุ้งกะเปาะ กุ้งฝอยน้ำเค็ม กุ้งกะต้อม กุ้งฝอย กุ้งก้ามกราม กุ้งตะกาด และกุ้งกะปิ ชนิดละประมาณ 30 – 50 ตัว นำมาเลี้ยงไว้ในอ่างขนาด 40 x 49 x 31 เซนติเมตรในน้ำที่มีความเค็ม 5 – 28 ppt อุณหภูมิและความยาวช่วงแสงธรรมชาติ

2. การพิสูจน์ทราบชนิด (Species Identification)

นำกุ้งชนิดต่าง ๆ ชนิดละ 3 ตัว ดองด้วยสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เขียนรายละเอียดสถานที่เก็บ วันที่เก็บ เพื่อมาเปรียบเทียบในการจำแนกลักษณะ โดยใช้หนังสือ FAO species catalogue vol. 1 – Shrimps and Prawns of the World ของ Holthuis (1980) วิทยานิพนธ์เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ต และ จังหวัดพังงา ของกัลยาณี ยงจินดารัตน์ (2531) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของกุ้งพลีโมนิค ในประเทศไทย ของนงนุช สีสายปะนาถ (2532) ในการพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้งได้กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* กุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* และกุ้งกะปิ *Caridina sp.*

3. การทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง

3.1 การตรวจการติดเชื้อตามธรรมชาติ

สุ่มตัวอย่างกุ้งชนิดต่าง ๆ ชนิดละมากกว่า 10 ตัว เพื่อตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ

3.2 การตรวจการติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อกึ่งกลูตาต้าที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

นำตัวอย่างกึ่งชนิดต่าง ๆ ชนิดละมากกว่า 10 ตัว เลี้ยงไว้ในอ่างขนาด 40 X 49 X 31 เซนติเมตร ให้อาหารเนื้อกึ่งกลูตาต้าที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองอย่างเดียว เข้า-เย็น วันละ 2 เวลา เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

3.3 การตรวจการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

นำตัวอย่างกึ่งชนิดต่าง ๆ ชนิดละมากกว่า 10 ตัว เลี้ยงไว้ในอ่างขนาด 40 X 49 X 31 เซนติเมตร ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่เจือจางใน 2x PBS 1:500 จำนวน 20 – 50 ไมโครลิตร (μ l) ต่อตัวกึ่ง ให้อาหารกึ่งเม็ดสำเร็จรูป ของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ เข้า – เย็น วันละ 2 เวลา เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

4. การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology (ภาพประกอบ 1)

4.1 นำตัวอย่างกึ่งที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติ กึ่งที่เลี้ยงด้วยเนื้อกึ่งกลูตาต้าที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและกึ่งที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง ฆ่าในน้ำเย็นจัด ตัดส่วนหัวและผ่าตัดกึ่งกลาง ตักระยางค์ส่วนขาเดินออก

4.2 นำส่วนหัวที่ผ่าแล้วไปทำให้คงรูป (fix) ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 นำหัวกึ่งมาล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างน้ำยาทำให้คงรูปออก

4.4 ตึงน้ำออก (dehydrate) จากหัวกึ่งด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ ต่าง ๆ และนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltrate) ด้วยพาราฟลาสต์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

4.4.1 นำหัวกึ่งมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.4.2 เปลี่ยนสารละลายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 90 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.4.3 เปลี่ยนสารละลายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % จำนวน 2 ครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4.4 เปลี่ยนสารละลายเป็นนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4.5 เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์กับไซลีน ในอัตราส่วน 1 : 1 แช่หัวกึ่งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4.6 เปลี่ยนสารละลายเป็นไซลีน จำนวน 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในขณะที่อยู่ในสารละลายไซลีน นำหัวกึ่งไปกำจัดฟองอากาศ โดยใส่ใน desicator แล้วไปกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่องปั๊มดูดอากาศ

4.4.7 เปลี่ยนสารละลายเป็นไซลีนผสมกับพาราฟลอสต์ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 30 นาที

4.4.8 เปลี่ยนสารละลายเป็นพาราฟลอสต์ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจำนวน 3 ครั้งเป็นเวลาครั้งละ 45 นาที

4.5 นำหัวกึ่งที่อินฟิลเตรตด้วยพาราฟลอสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราฟลอสต์ โดยเทพาราฟลอสต์ขณะที่หลอมเหลวลงไปในบล็อก (block) สี่เหลี่ยมจากนั้นใช้ปากคีบสนไฟจับหัวกึ่งแต่ละหัวฝังในพาราฟลอสต์ โดยให้ด้านรอยผ่าของหัวกึ่งอยู่ทางด้านล่างของบล็อก

4.6 ตัดหัวกึ่งที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องมือโครโตมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนาขนาด 10 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบอน (ribbon) โดยตัดทางด้านล่างของบล็อกหรือตัดตามรอยผ่าของหัวกึ่ง

4.7 นำเซกชั่น (section) ของหัวกึ่งมาติดบนสไลด์แก้ว เรียงตามลำดับเลือกเซกชั่นที่เห็นเนื้อเยื่อภายในตัดผ่านสมบูรณ์ โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วยเจลาติน (gelatin) ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชั่นไปวางบนหยดน้ำ 1 แถวมี 3 เซกชั่น 1 แถวต่อ 1 สไลด์ นำสไลด์วางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไม่ควรเกิน 50 องศาเซลเซียส เพราะจุดหลอมเหลวของพาราฟินอยู่ที่ 58 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงจะทำให้เนื้อเยื่อกรอบ เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยืดยึดดีไม่มีการซ้อนทับกันของเนื้อเยื่อแล้ว นำลงมาซับน้ำออกให้แห้งจนหมด เพื่อให้เนื้อเยื่อติดตรึงบนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ข้ามคืนก่อนนำมาใช้ หากซับน้ำออกไม่แห้งให้อบในตู้อบจนน้ำออกหมดและแน่ใจว่าเนื้อเยื่อติดตรึงบนสไลด์ดีแล้วจึงค่อยนำมาใช้

5. กระบวนการย้อมโดยวิธีอินไดเรกต์อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (indirect immunoperoxidase method) ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 โดยมีขั้นตอนดังนี้ (ภาพประกอบ 2)

5.1 นำสไลด์ที่มีเซกชั่นมาละลายเอาพาราฟลอสต์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดยวางสไลด์ลงในตะกร้า (slide basket) แล้วจุ่มลงในโถแก้วย้อมสไลด์โดยแช่หัวกึ่งใน

5.1.1 โซลีนที่ 1 เป็นเวลา 10 นาที

5.1.2 โซลีนที่ 2 เป็นเวลา 5 นาที

5.1.3 โซลีนที่ 3 เป็นเวลา 5 นาที

5.2 เติมน้ำ (hydration) เข้าสู่เนื้อเยื่อหัวกุ้งด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ โดยแช่หัวกุ้งใน

5.2.1 นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที

5.2.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 5 นาที

5.2.3 เอทิลแอลกอฮอล์ 90 % เป็นเวลา 5 นาที

5.2.4 เอทิลแอลกอฮอล์ 80 % เป็นเวลา 5 นาที

5.2.5 เอทิลแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 5 นาที

5.3 ล้างเนื้อเยื่อหัวกุ้งด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย phosphate buffered saline (PBS) เพื่อล้างเอาแอลกอฮอล์ออกให้หมดโดย

5.3.1 จุ่มล้างเนื้อเยื่อหัวกุ้งด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที

5.3.2 แช่เนื้อเยื่อหัวกุ้งด้วยสารละลายฟอรัมาลิน ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที

5.3.3 ล้างฟอรัมาลินออกจากเนื้อเยื่อหัวกุ้งด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

5.3.4 ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

5.4 ดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกหัวกุ้งโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

5.5 ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลาย P_1^+ หยดให้คลุมแต่ละเซกชัน เพื่อป้องกันการจับของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ บ่ม (incubate) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันไม่ให้เซกชันแห้ง นำไปเก็บไว้ในที่ชื้นโดยอาจเก็บในกล่องหรือจานเลี้ยงเชื้อ ปิดฝาภาชนะในตู้ด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้น

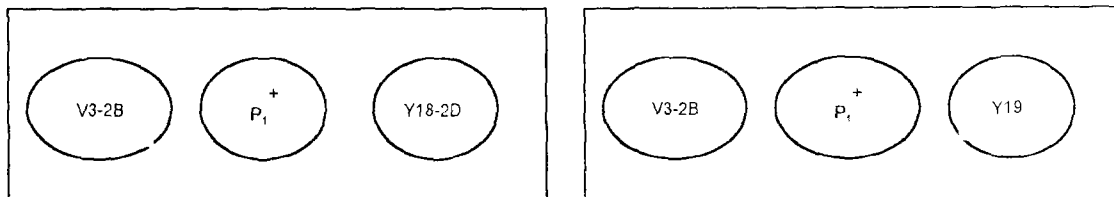
5.6 ใส่ first antibody

5.6.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก ยกเว้น เซกชันที่ 2

5.6.2 หยด first antibody ให้คลุมแต่ละเซกชัน First antibody ที่ใช้คือ

5.6.2.1 โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ที่เซกชันที่ 1

5.6.2.2 ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D หรือไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่เซตชั้นที่ 3 (ดังภาพประกอบ 3) ไมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสามเจือจาง 1:5 ด้วย P_1^+



ภาพประกอบ 3 แสดงการหยด first antibody ในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัดเหลือง

5.6.2.3 นำเนื้อเยื่อห้วกึ่งกลางดำที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองโดยการฉีดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็น positive control โดยหยด first antibody ในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัดเหลืองในแต่ละเซตชั้น เช่นเดียวกับภาพประกอบ 3

5.6.2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

5.7 ล้างเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย PBS

5.7.1 ล้างเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยน้ำกลั่น อย่างรวดเร็วเพื่อล้างเอาแอนติบอดีออก

5.7.2 ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

5.8 ใส่ secondary antibody

5.8.1 ดูดสารละลาย PBS ในแต่ละเซตชั้นออก

5.8.2 หยด secondary antibody ให้คลุมแต่ละเซตชั้น Second antibody ที่ใช้คือ goat anti-mouse horseradish peroxidase (GAM-HRP) ที่เจือจางใน P_1^+ 1:1000

5.8.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.9 ล้างเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย PBS

5.9.1 ล้างเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยน้ำกลั่น เพื่อล้างเอาแอนติบอดีออก

5.9.2 ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

5.10 นำเนื้อเยื่อห้วกึ่งมาทำปฏิกิริยากับ 3, 3' ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ 0.03% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006% ที่ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ให้ผล positive สามารถเห็นเป็นสีน้ำตาล

5.11 ล้างเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5.12 ย้อมด้วยสี haematoxylin เป็นเวลา 5-10 นาที

5.12.1 ล้างเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อล้างสีส่วนเกินออก

5.12.2 จุ่มเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก โดยมีความเข้มข้น 0.05% ออกอย่างรวดเร็ว

5.12.3 ล้างเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที

5.12.4 จุ่มเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยมีความเข้มข้น 1 % อย่างรวดเร็ว

5.12.5 ล้างเนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที (หากจะย้อมด้วยสี eosin อย่างเดียวได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย้อมสี hematoxylin)

5.13 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อห้วกึ่ง โดยใส่ในแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ โดยแช่ใน

5.13.1 เอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที

5.13.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 80% เป็นเวลา 5 นาที

5.13.3 เอทิลแอลกอฮอล์ 90% เป็นเวลา 5 นาที

5.13.4 เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 5 นาที

5.14 ย้อมทับ (counterstain) เนื้อเยื่อห้วกึ่งด้วยสี eosin 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

5.15 นำเนื้อเยื่อห้วกึ่งมาดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อห้วกึ่งโดยผ่านสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

5.15.1 นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที

5.15.2 สารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์กับไซลีน (1:1) เป็นเวลา 5 นาที

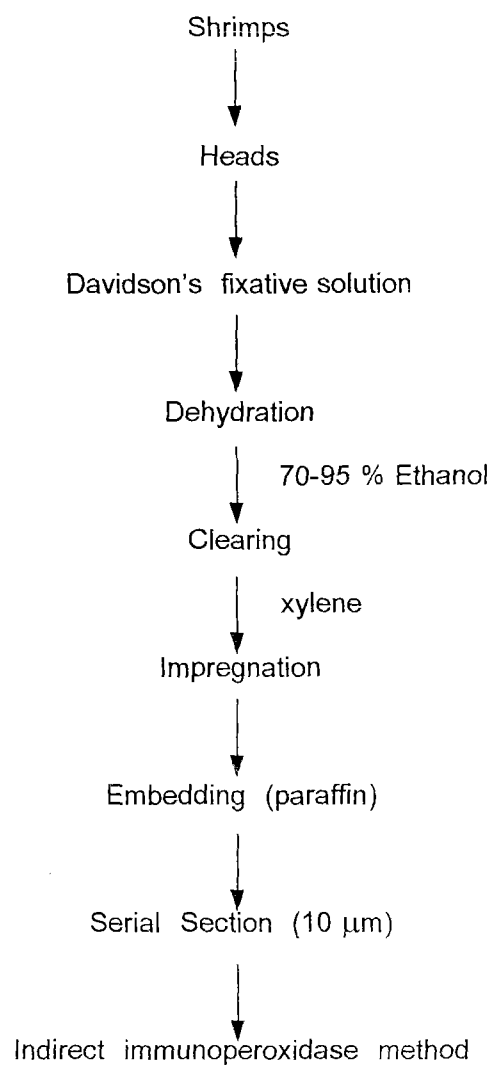
5.15.3 ไซลีน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

5.16 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยผนึก (mount) ด้วยเปอร์เม้าท์ (permount) ทำโดยหยดเปอร์เม้าท์ประมาณ 3 หยด บนสไลด์และขอบด้านหนึ่งของกระจกปิดสไลด์บนเปอร์เม้าท์ โดยเอียงประมาณ 45 องศาแล้วค่อย ๆ วางลง ควรระวังมิให้ฟองอากาศเกิดขึ้น หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นให้นำสไลด์มาล้างเปอร์เม้าท์ออกด้วยไซลีนแล้วค่อยทำการผนึกสไลด์ใหม่อีกครั้ง

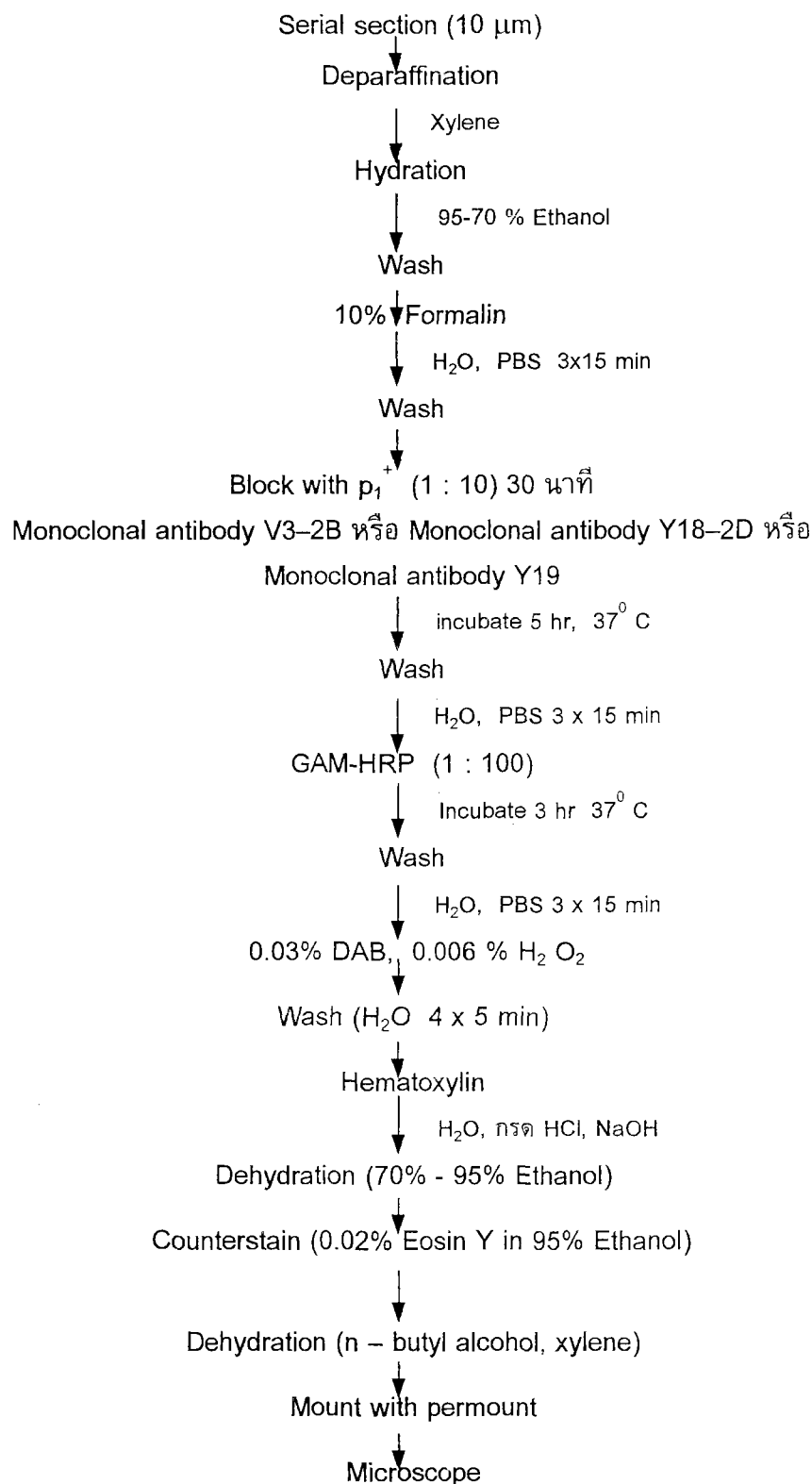
5.17 นำสไลด์ที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งของไวรัสหัวเหลือง ในทุกเซกชันด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากการติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีเปอร์ออกซิเดส ในบริเวณต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อหัวกุ้ง

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. พิสูจน์ชนิดตัวอย่างกุ้งที่เก็บได้
2. ตรวจดูและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ในเนื้อเยื่อบริเวณหัวกุ้ง
3. ตรวจดูการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของอวัยวะต่าง ๆ ในบริเวณเนื้อเยื่อหัวกุ้งชนิดต่าง ๆ ในแต่ละวงศ์
4. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
5. นำเสนอข้อมูลด้วยภาพและตาราง



ภาพประกอบ 1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology



ภาพประกอบ 2 ขั้นตอนการตรวจหาเชื้อไวรัสหัดเหลืองในเนื้อเยื่อแก้วโดยวิธีอินไดเรคติมมูโน-
เปอร์ออกซิเดส (Indirect immunoperoxidase method)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้ง

จากการเก็บรวบรวมโดยใช้สวิงช้อนเก็บกุ้งจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในอำเภอพระสมุทรเจดีย์ อำเภอบางปะอิน จังหวัดสมุทรปราการ อำเภอเมือง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และอำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี นำกุ้งมาดูลักษณะต่าง ๆ เช่น กะ carapace แผ่นก้ามบังหนวด ขาเดินหาง แพนหาง และสีลำตัว เป็นต้น โดยเทียบกับหนังสือ FAO Species Catalogue Vol.1-Shrimps and Prawns of the World ของ Holthuis (1980) วิทยานิพนธ์เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืด ในจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดพังงา ของกัลยานี ยงจินตารัตน์ (2531) วิทยานิพนธ์เรื่อง อนุกรมวิธานของกุ้งฝิ่นน้อยในประเทศไทย ของนงนุช ลีลาปิยะนาถ (2532) และวิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนิโคในประเทศไทย ของพิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล (2518) ในการพิสูจน์ทราบชนิดกุ้ง สามารถพิสูจน์ทราบกุ้งชนิดต่าง ๆ ได้ดังนี้

1.1 วงศ์ Palaemonidae

สามารถจำแนกกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 2 สกุล (genus) 5 ชนิด (species) คือ

กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* พบมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งกะเปาะ ก้ามมีลักษณะเรียวยาว ปลายของกริ๊งอนขึ้น ลำตัวใสไม่มีสี ส่วนโคนของข้อที่ 6 ของขาเดินคู่ที่ 2 พองเป็นกะเปาะ (ภาพประกอบ 4)

กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* พบมากในป่าชายเลน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำเค็ม ก้ามมีลักษณะตรงตอนปลายงอนขึ้นเล็กน้อย ลำตัวใสไม่มีสี ขาเดินคู่ที่ 2 ยาวเท่ากัน ผิวโดยรอบมีลายประสีน้ำตาล (ภาพประกอบ 5)

กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* พบมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งกะต้อม ก้ามมีลักษณะเรียวยาว ลำตัวเป็นสีน้ำตาลหรือฟ้าแกมเขียว ขาเดินคู่ที่ 2 มีปื้นสีน้ำตาลกระจายอยู่เป็นหย่อมรอยต่อระหว่างของขาเดินคู่ที่ 3 คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 มีสีส้มแกมแดง (ภาพประกอบ 6)

กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* พบมากในบ่อเลี้ยงกุลาดำในอำเภพระสมุทรเจดีย์ และในบ่อน้ำจืด อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งฝอย กริมีลักษณะตรงและยาวพอดีกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอก ยาวเรียวและมีส่วนของก้ามหนีบ ยาวเลยปลายของกริลำตัวใสไม่มีสี (ภาพประกอบ 7)

กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบมากในบ่อเลี้ยงกุลาดำในอำเภพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ และในบ่อน้ำจืดอำเภเมือง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ลักษณะของกุ้งก้ามกราม กริส่วนโคนที่อยู่เหนือตาโค้งนูนขึ้นและส่วนปลายเรียวบนขึ้น ขาเดินคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่และยาวไม่เท่ากัน ผิวด้านนอกของขาเดินมีหนามแหลมเรียงอยู่กระจัดกระจาย นิ้วของก้ามหนีบเคลื่อนไหวได้ มีขนปุกปุยคลุมอย่างหนาแน่น (ภาพประกอบ 8)

1.2 วงศ์ Penaeidae

สามารถจำแนกกุ้งในวงศ์ Penaeidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) 2 ชนิด (species) คือ

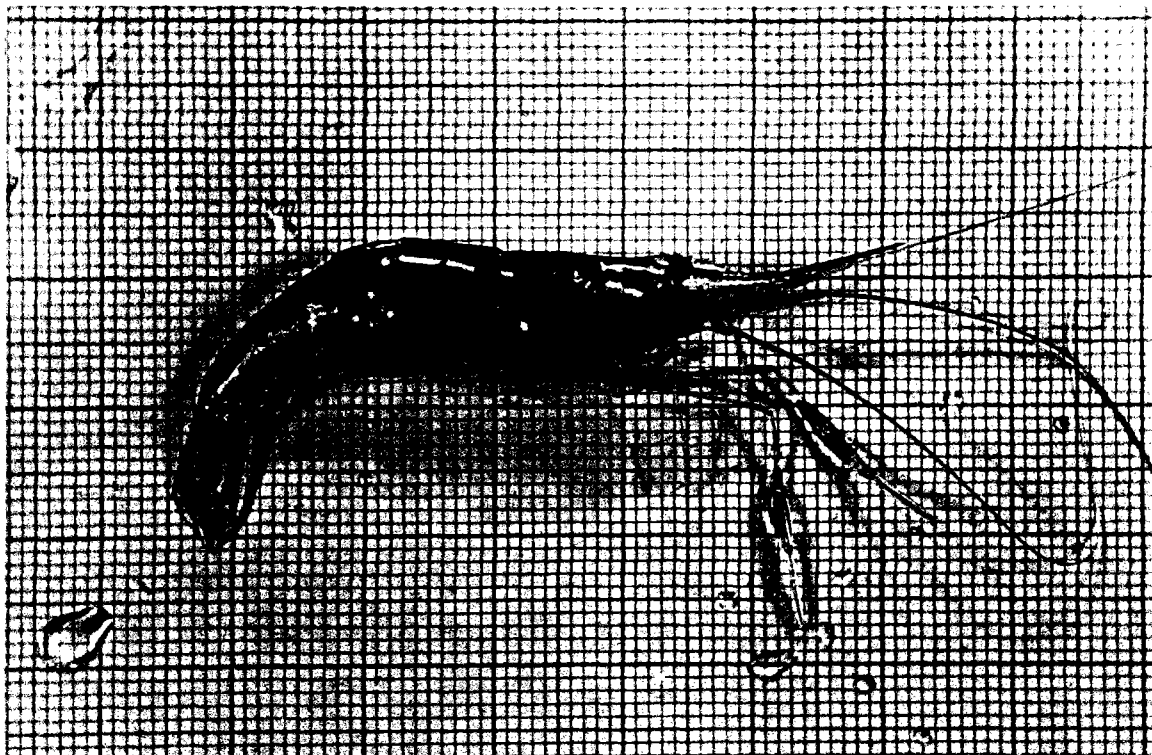
กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* พบมากในบ่อเลี้ยงกุลาดำในอำเภพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งตะกาด กริยาวเรียว ส่วนปลายโค้งขึ้นเล็กน้อย ปลายกริสิ้นสุดบริเวณปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 ขอบด้านบนมีฟัน 8 ถึง 10 ซี่ ขอบด้านล่างเรียบไม่มีฟัน Carapace และลำตัวมีสีน้ำตาล มีจุดสีเขียว แดง และน้ำตาลกระจายอยู่ประปรายทั่วไป แพนหางมีสีน้ำตาลแดงเข้ม บริเวณส่วนปลายมีสีฟ้า มีขนสีแดงอยู่รอบ ๆ (ภาพประกอบ 9)

กุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* พบมากในบ่อเลี้ยงกุลาดำในอำเภพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง กริยาวตรงโคนกริมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ปลายกริยาวถึงปลายปล้องที่ 2 ของก้านหนวดคู่ที่ 1 (ในกุ้งเพศผู้ปลายกริจะยาวแค่ปลายปล้องแรกของก้านหนวดคู่ที่ 1) Carapace และลำตัวมีสีเหลือง มีจุดสีน้ำตาลแดงและเขียวกระจายอยู่ทั่วไป แพนหางมีสีค่อนข้างแดง (ภาพประกอบ 10)

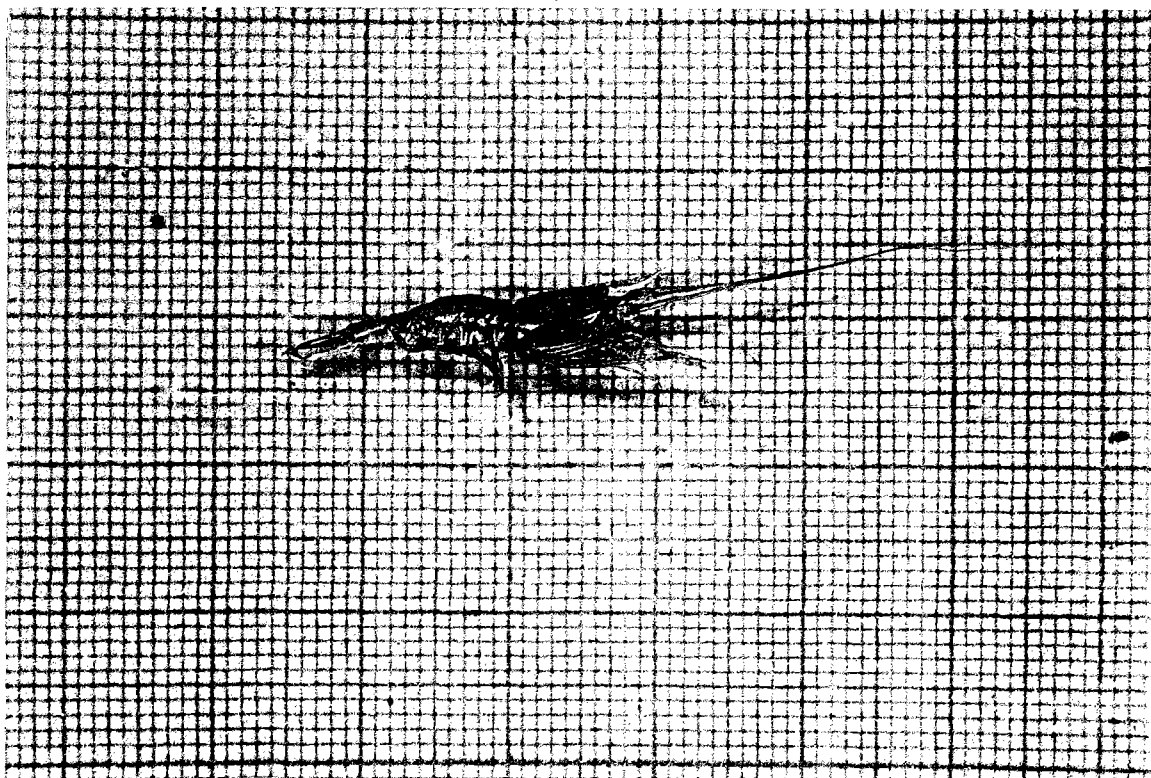
1.3 วงศ์ Atyidae

สามารถจำแนกกุ้งในวงศ์ Atyidae ที่รวบรวมได้ออกเป็น 1 สกุล (genus) คือ

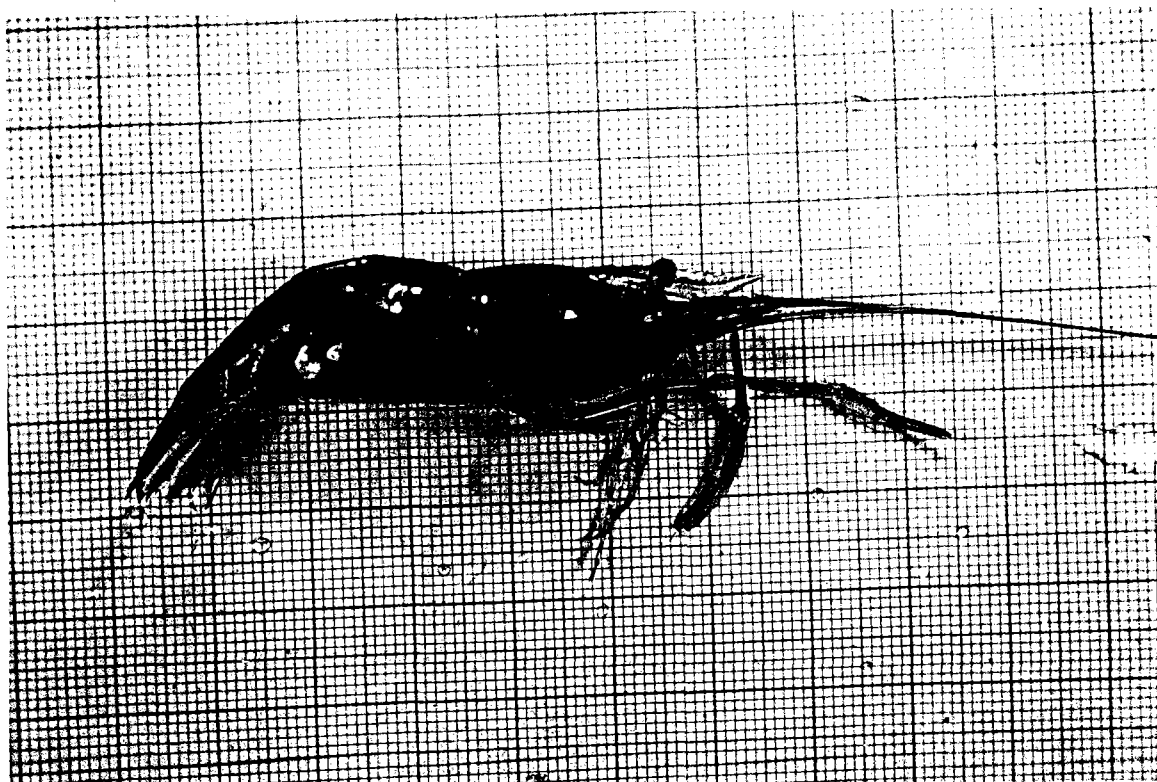
กุ้งกะปิ *Caridina* sp. พบมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งกะปิ กริเรียบหรือมีฟันไม่มีหนามเหนือเบ้าตา มีหนามบริเวณด้านข้างของ carapace ขาเดินคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 มีลักษณะเป็นก้ามหนีบ บริเวณส่วนปลายของนิวทั้งสองมีขนเป็นพู่ (ภาพประกอบ 11)



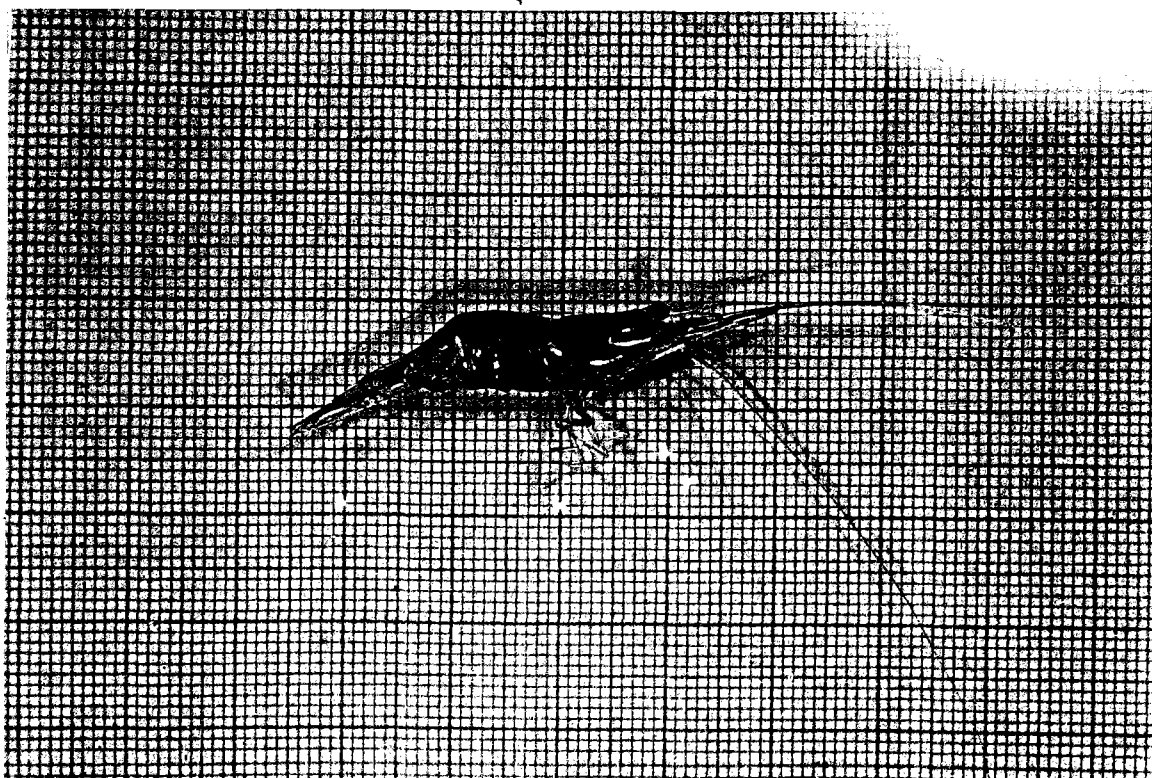
ภาพประกอบ 4 ลักษณะของกุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus*



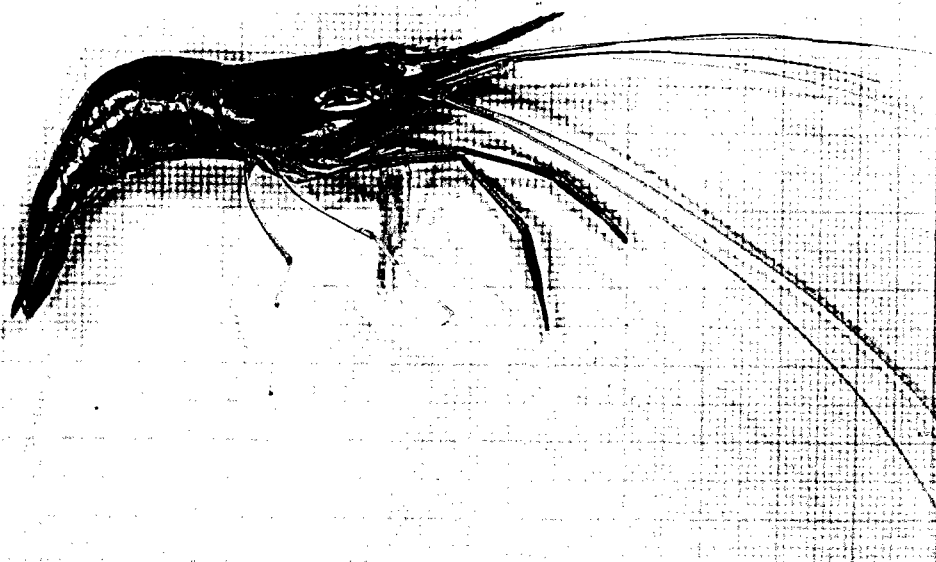
ภาพประกอบ 5 ลักษณะของกุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer*



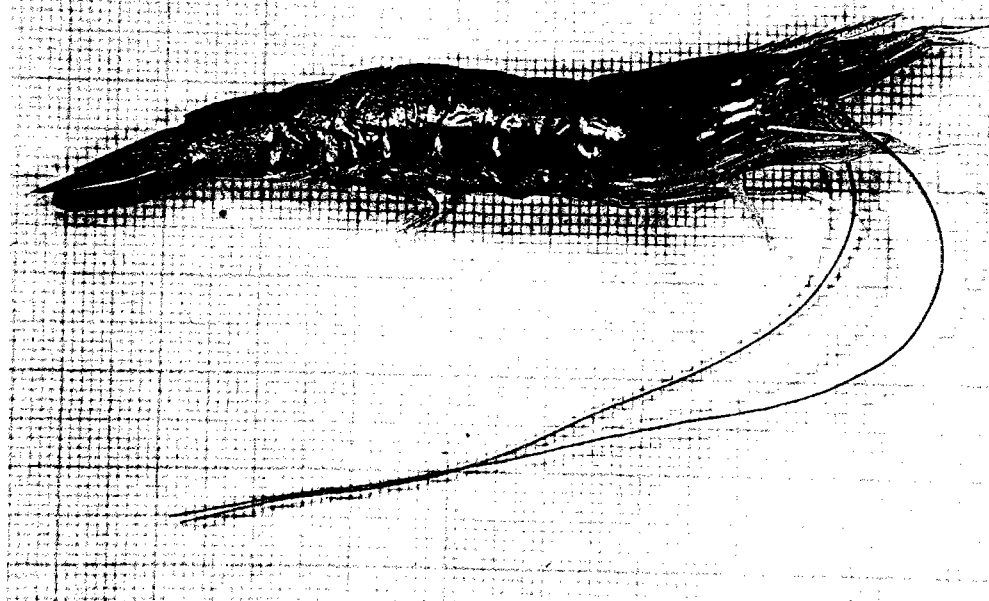
ภาพประกอบ 6 ลักษณะของกุ้งกะต๋อม *Macrobrachium sintangense*



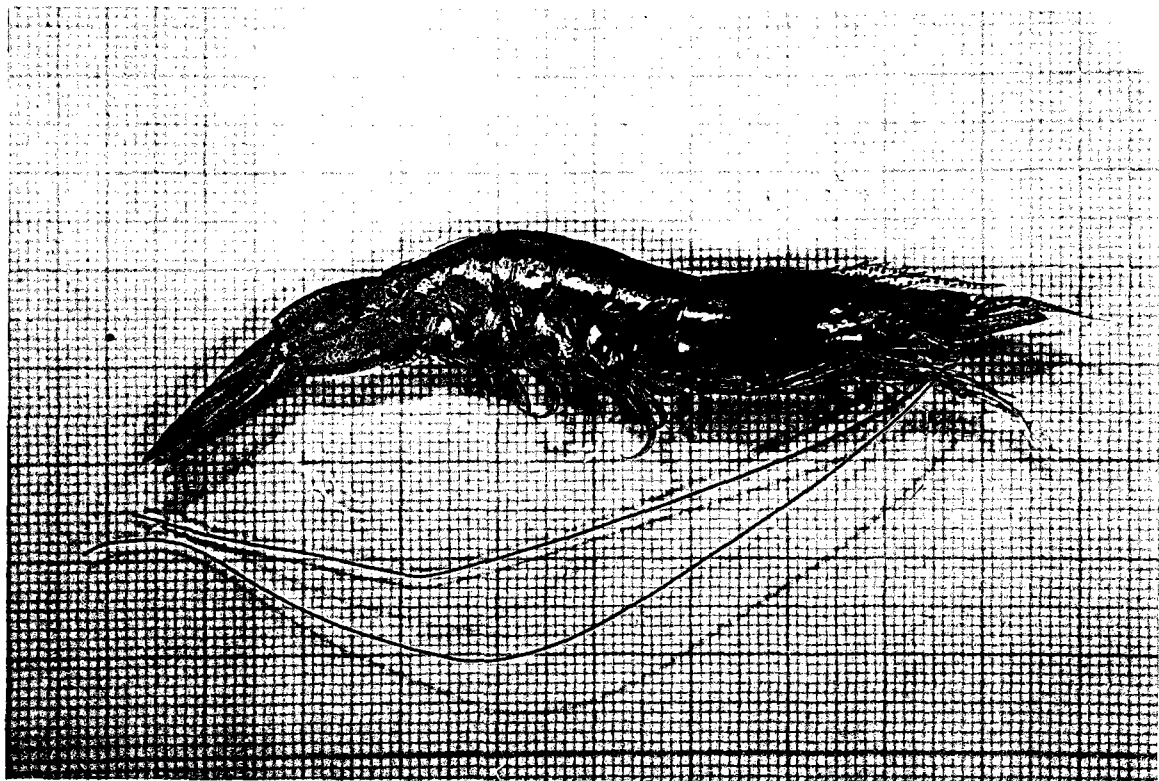
ภาพประกอบ 7 ลักษณะของกุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri*



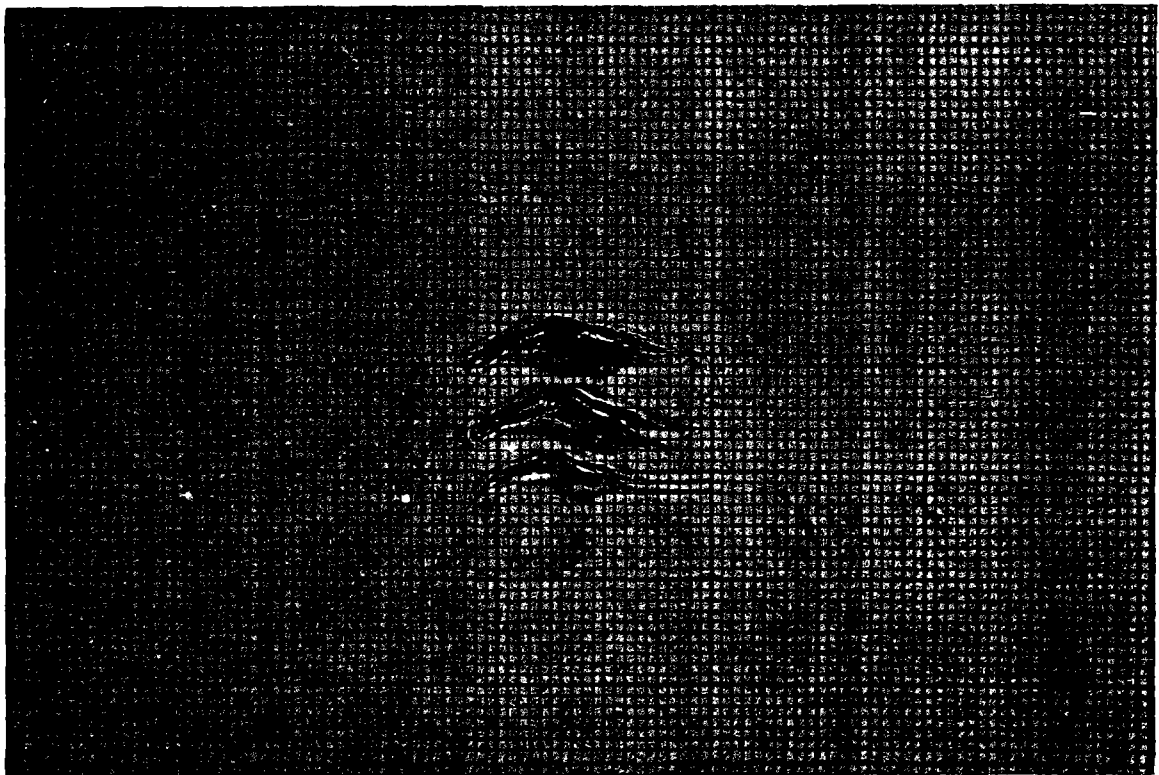
ภาพประกอบ 8 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*



ภาพประกอบ 9 ลักษณะของกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis*



ภาพประกอบ 10 ลักษณะของกุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis*



ภาพประกอบ 11 ลักษณะของกุ้งกะปิ *Caridina* sp.

2. การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยวิธี Immunocytochemistry ในเนื้อเยื่อกุ้งชนิดต่าง ๆ

2.1 การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการสำรวจกุ้งตามธรรมชาติ

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากกุ้งที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติชนิดต่าง ๆ 3 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae ได้ผลดังนี้

2.1.1 กุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งฝอย *Palaemon serrifer* กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ชนิดละจำนวน 10 ตัว มาตรฐานการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณหัวใจ ปมประสาท อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อวัยวะ antennal gland เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก ตัวอ่อน และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทุกเนื้อเยื่อในกุ้งทุกชนิดของวงศ์ Palaemonidae ดังแสดงในตาราง 1

2.1.2 กุ้งในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* กุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* ชนิดละจำนวน 10 ตัว มาตรฐานการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณหัวใจ ปมประสาท อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อวัยวะ antennal gland เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก ตัวอ่อน เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทุกเนื้อเยื่อในกุ้งทั้ง 2 ชนิดของวงศ์ Penaeidae ดังแสดงในตาราง 1

2.1.3 กุ้งในวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ *Caridina sp.* จำนวน 30 ตัว มาตรฐานการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณ หัวใจ ปมประสาท อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อวัยวะ antennal gland เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก ตัวอ่อน และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทุกเนื้อเยื่อในกุ้งกะปิทุกตัว ดังแสดงในตาราง 1

2.2 การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และเลี้ยงในอ่างน้ำปรับความเค็ม 5 – 28 ppt ความเค็ม 5 ppt สำหรับ กุ้งกะต้อม กุ้งฝอย กุ้งก้ามกราม กุ้งกะเปาะ กุ้งตะกาด กุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง และกุ้งกะปิ

ความเค็ม 28 ppt สำหรับกุ้งฝอยน้ำเค็ม ในกุ้ง 3 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae ได้ผลดังนี้

2.2.1 กุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ชนิดละจำนวน 10 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณ หัวใจ ปมประสาท อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อัณฑะ antennal gland เนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก ตัวอ่อน และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทุกเนื้อเยื่อในกุ้งทุกชนิดของวงศ์ Palaemonidae ดังแสดงในตาราง 2

2.2.2 กุ้งในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* และกุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* ชนิดละ 10 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณ หัวใจ ปมประสาท อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อัณฑะ antennal gland เนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก ตัวอ่อน และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* ที่บริเวณหัวใจ 3 ตัว (ภาพประกอบ 12) อวัยวะน้ำเหลือง 3 ตัว (ภาพประกอบ 13) กล้ามเนื้อ 3 ตัว (ภาพประกอบ 14) เหงือก 4 ตัว (ภาพประกอบ 15) ตับและตับอ่อน 3 ตัว (ภาพประกอบ 16) รังไข่ 2 ตัว (ภาพประกอบ 17) อัณฑะ 1 ตัว (ภาพประกอบ 18) เนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก 4 ตัว (ภาพประกอบ 19) รวมจำนวนกุ้งที่ติดเชื้อ 4 ตัว จาก 10 ตัว แต่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในทุกๆบริเวณเนื้อเยื่อกุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* ทุกตัว ดังแสดงในตาราง 2

2.2.3 กุ้งในวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ *Caridina sp.* จำนวน 27 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณหัวใจ ปมประสาท อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อัณฑะ antennal gland เนื้อเยื่อบุผิวได้เปลือก ตัวอ่อน และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทุกเนื้อเยื่อในกุ้งกะปิทุกตัว ดังแสดงในตาราง 2

2.3 การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน เลี้ยงในอ่างน้ำปรับความเค็ม 5 ppt ในกุ้ง 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Palaemonidae และ Penaeidae ได้ผลดังนี้

2.3.1 กุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ชนิดละประมาณ 10 – 12 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในเนื้อเยื่อที่บริเวณหัวใจ ปมประสาท อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อัณฑะ antennal gland เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก ตัวอ่อน และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด พบ การติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ดังแสดงในตาราง 3 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งต่าง ๆ ของวงศ์ Palaemonidae มีดังนี้

2.3.1.1 กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในเนื้อเยื่อที่บริเวณหัวใจ 8 ตัว (ภาพประกอบ 20) กล้ามเนื้อ 9 ตัว (ภาพประกอบ 21) เหงือก 2 ตัว (ภาพประกอบ 22) ตับและตับอ่อน 9 ตัว (ภาพประกอบ 23) รังไข่ 3 ตัว (ภาพประกอบ 24) เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก 9 ตัว (ภาพประกอบ 25) เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด 4 ตัว (ภาพประกอบ 26) รวม 9 ตัวจาก 10 ตัว

2.3.1.2 กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อที่บริเวณหัวใจ 7 ตัว (ภาพประกอบ 27)) กล้ามเนื้อ 5 ตัว (ภาพประกอบ 28) ตับและตับอ่อน 8 ตัว (ภาพประกอบ 29) อัณฑะ 1 ตัว (ภาพประกอบ 30) เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก 7 ตัว (ภาพประกอบ 31) รวม 8 ตัวจาก 12 ตัว

2.3.1.3 กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* ทั้งที่อาศัยในน้ำกร่อยและน้ำจืด พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อที่บริเวณหัวใจ 3 ตัว (ภาพประกอบ 32) กล้ามเนื้อ 4 ตัว (ภาพประกอบ 33) เหงือก 1 ตัว (ภาพประกอบ 34) ตับและตับอ่อน 4 ตัว (ภาพประกอบ 35) รังไข่ 1 ตัว (ภาพประกอบ 36) เนื้อเยื่อผิวหนังได้เปลือก 2 ตัว (ภาพประกอบ 37) รวม 4 ตัว จาก 22 ตัว

2.3.1.4 กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งก้ามกรามที่อาศัยในน้ำกร่อยในเนื้อเยื่อที่บริเวณหัวใจ 1 ตัว (ภาพประกอบ 38)

กล้ามเนื้อ 1 ตัว (ภาพประกอบ 39) ตับและตับอ่อน 1 ตัว (ภาพประกอบ 40) antennal gland 1 ตัว (ภาพประกอบ 41) ส่วนกึ่งก้ามกรามที่อาศัยในน้ำจืดทุกตัวไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง รวม 1 ตัว จาก 21 ตัว

2.3.2 กุ้งในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* และกุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* จำนวน 10 – 11 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อที่บริเวณหัวใจ ปมประสาท อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อ เหงือก ตับ และตับอ่อน รังไข่ อันทะ antennal gland เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก ตัวอ่อน และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ดังแสดงในตาราง 3 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง 2 ชนิดของวงศ์ Penaeidae ได้ผลดังนี้

2.3.2.1 กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อที่บริเวณหัวใจ 10 ตัว (ภาพประกอบ 42) อวัยวะน้ำเหลือง 7 ตัว (ภาพประกอบ 43) กล้ามเนื้อ 10 ตัว (ภาพประกอบ 44) เหงือก 11 ตัว (ภาพประกอบ 45) ตับและตับอ่อน 7 ตัว (ภาพประกอบ 46) รังไข่ 4 ตัว (ภาพประกอบ 47) เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก 8 ตัว (ภาพประกอบ 48) ติดเชื้อทุกตัวจาก 11 ตัว

2.3.2.2 กุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อที่บริเวณหัวใจ 6 ตัว (ภาพประกอบ 49) ปมประสาท 2 ตัว (ภาพประกอบ 50) อวัยวะน้ำเหลือง 8 ตัว (ภาพประกอบ 51) กล้ามเนื้อ 9 ตัว (ภาพประกอบ 52) เหงือก 10 ตัว (ภาพประกอบ 53) ตับและตับอ่อน 9 ตัว (ภาพประกอบ 54) รังไข่ 3 ตัว (ภาพประกอบ 55) อันทะ 3 ตัว (ภาพประกอบ 56) antennal gland 1 ตัว (ภาพประกอบ 57) เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก 4 ตัว (ภาพประกอบ 58) ติดเชื้อทุกตัวจาก 10 ตัว

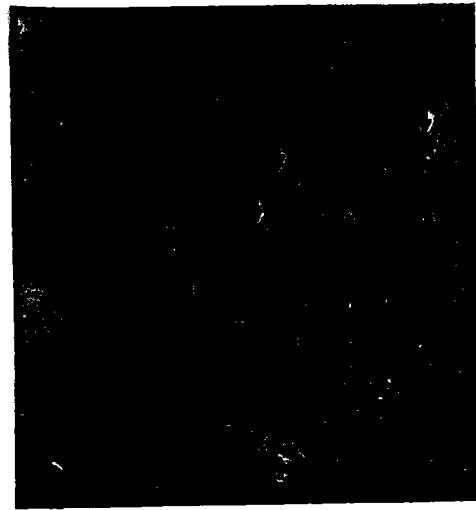
ส่วนกุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* และกุ้งกะปิ *Caridina sp.* ไม่ได้ทำการทดลองการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากขนาดเล็ก ฉีดแล้วตายหมดภายในเวลา 1 วัน และไม่พบการติดเชื้อ

ตาราง 3 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในแต่ละอวัยวะบริเวณส่วนหัวของกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่ติดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน

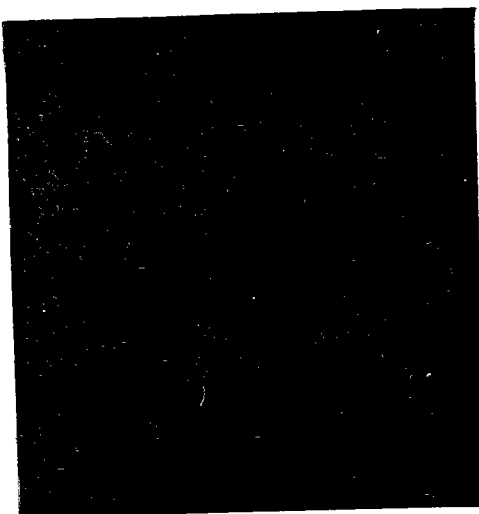
ชนิดกุ้ง	อวัยวะ	Heart	Neuronal ganglion	Lymphoid organ	Muscle	Gill	Hepato pancreas	Ovary	Testis	Antennal gland	Subcuticular epithelium	Embryo	Hematopoietic tissue	จำนวนกุ้งที่ติดเชื้อ/ทั้งหมด
วงศ์ Palaemonidae <i>Palaemon styliiferus</i> <i>Palaemon serrifer</i>		8	0	0	9	2	9	3	0	0	9	0	4	9/10
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ไม่ได้ทำการทดลอง
		7	0	0	5	0	8	0	1	0	8	0	0	8/12
<i>Macrobrachium sintangense</i> <i>Macrobrachium lanchesteri</i> (น้ำกร่อย)		1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1/12
		2	0	0	3	1	3	1	0	0	1	0	0	3/10
		1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1/11
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (น้ำกร่อย) <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (น้ำจืด)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
วงศ์ Penaeidae <i>Metapenaeus affinis</i> <i>Metapenaeus Brevicornis</i>		10	0	7	10	11	7	4	0	0	8	0	0	11/11
		6	2	8	9	10	9	3	3	1	4	0	0	10/10
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ไม่ได้ทำการทดลอง



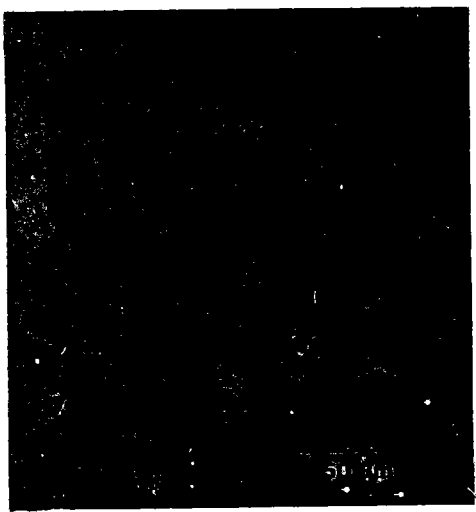
ก



ข



ค



ง

ภาพประกอบ 12 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ลูกศรหรือสีน้ำตาล)

ของเนื้อเยื่อบริเวณหัวใจของ *Metapenaeus affinis* ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส

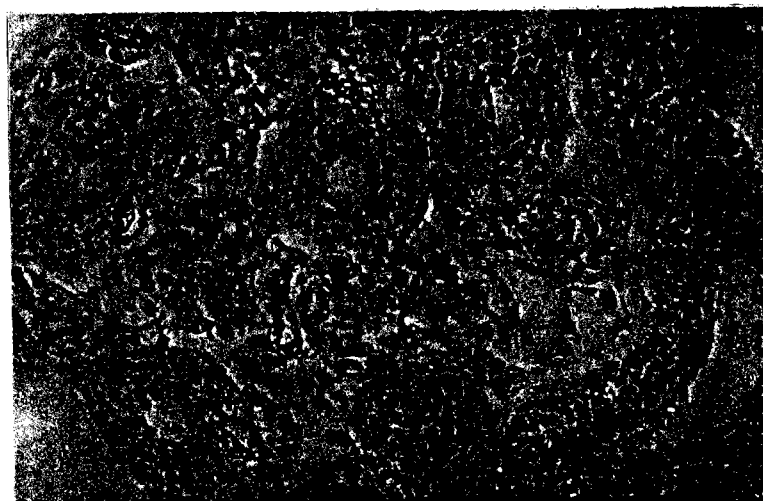
หัวเหลืองโดยใช้

ก = ไม่หยด first antibody

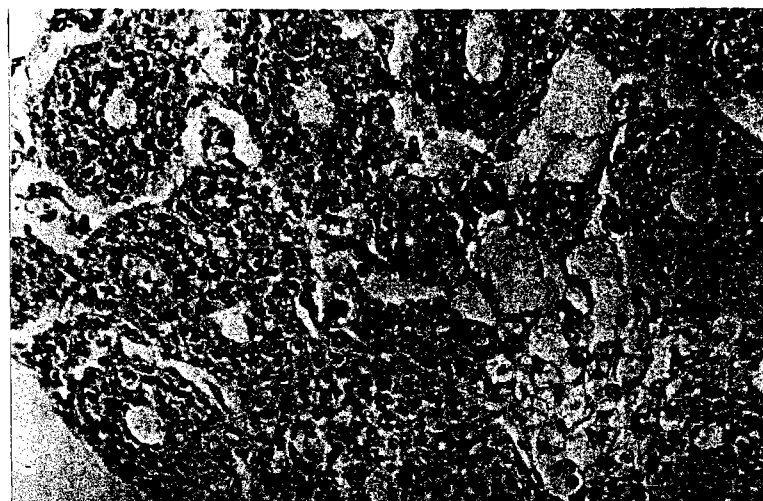
ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

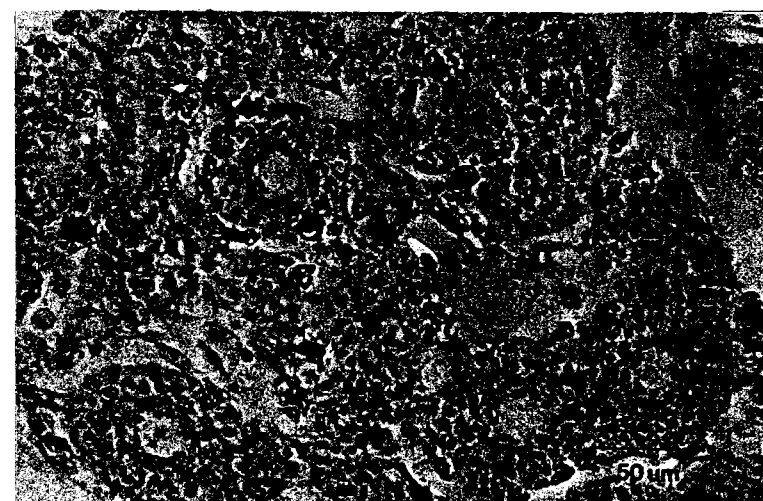
ง = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก

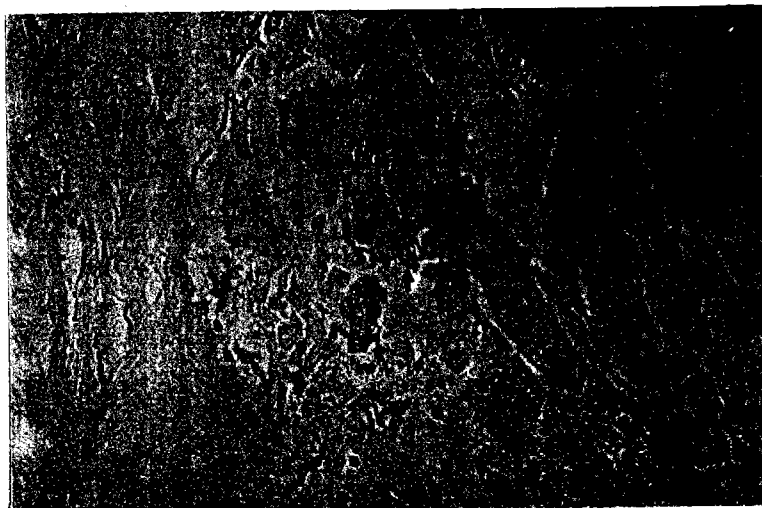


ข

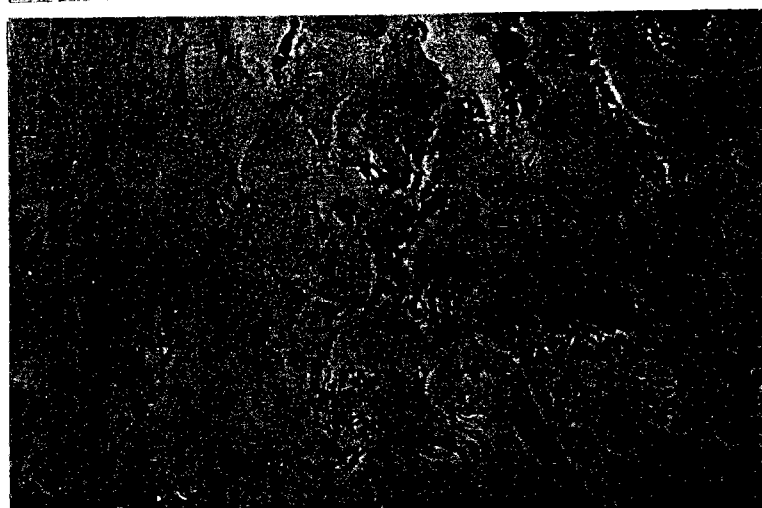


ค

ภาพประกอบ 13 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ
อวัยวะนำเหลืองของ *Metapenaeus affinis* ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B
ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

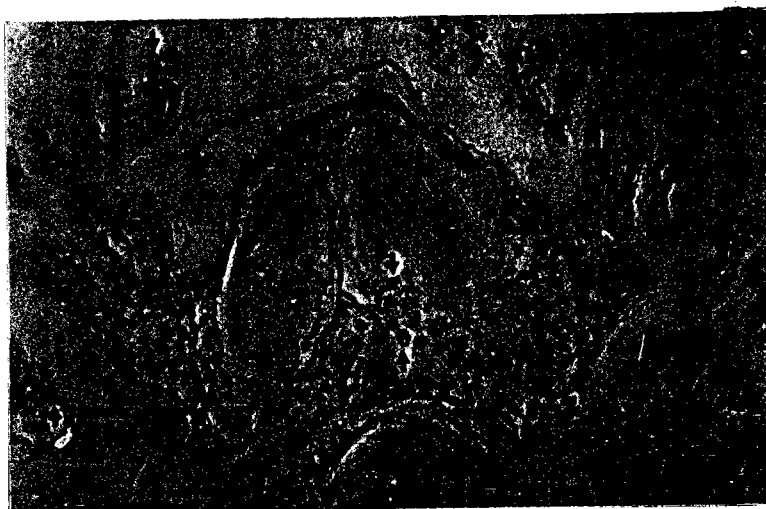
ภาพประกอบ 14 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณกล้ามเนื้อของ *Metapenaeus affinis* ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

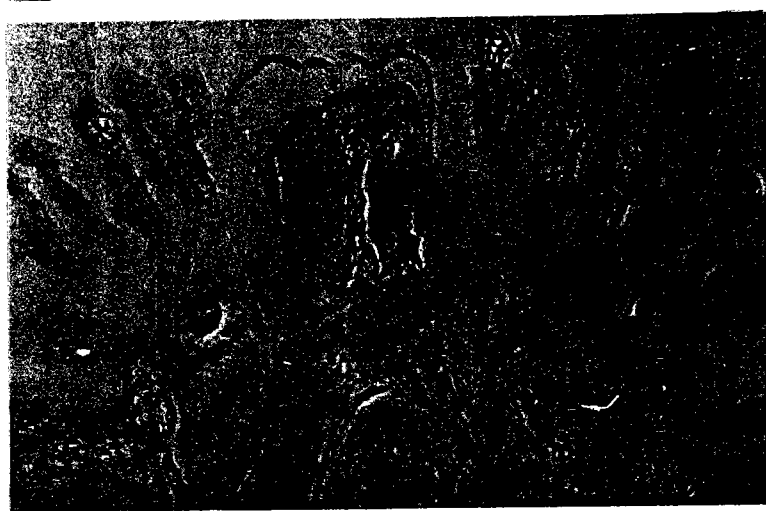
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

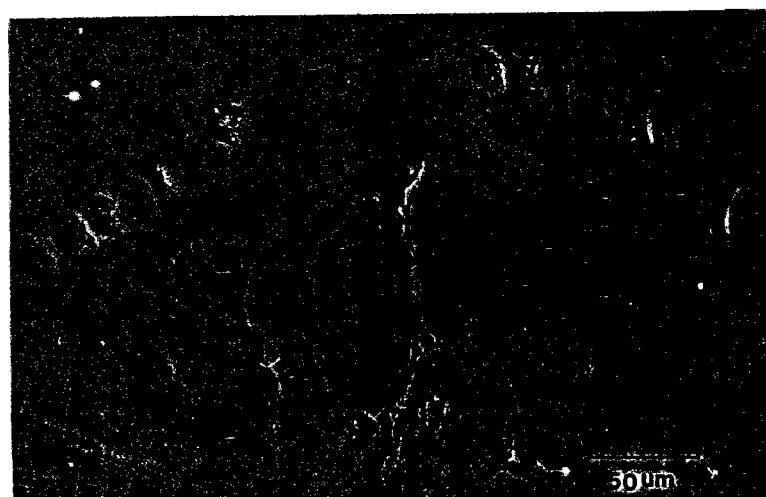
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 15 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณเหงือกกุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

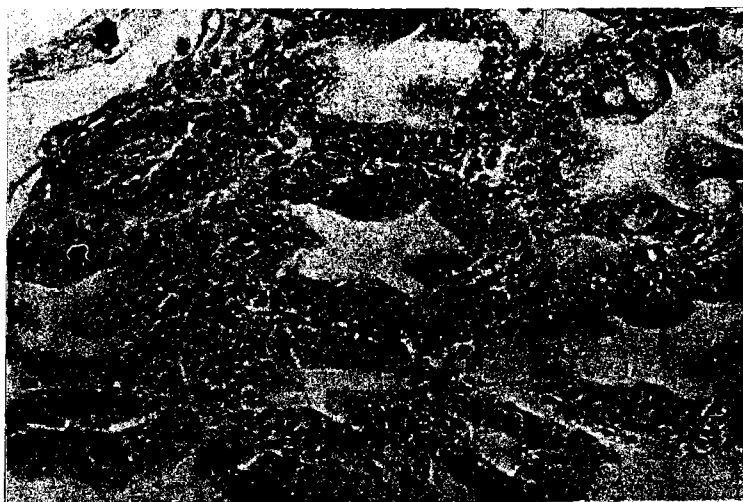
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

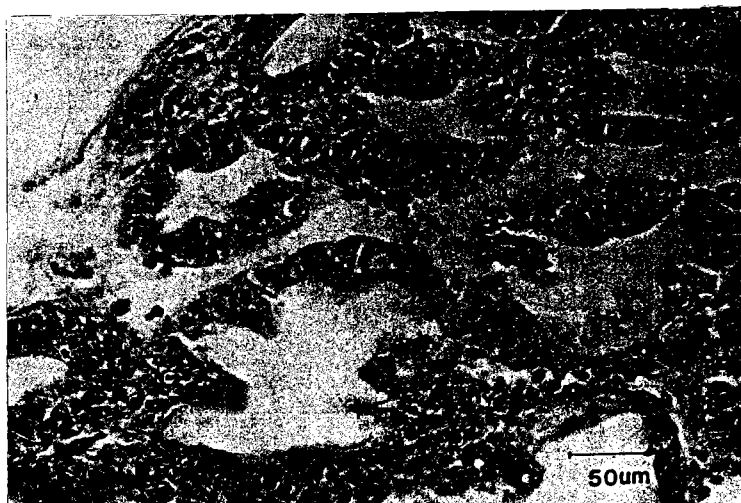
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



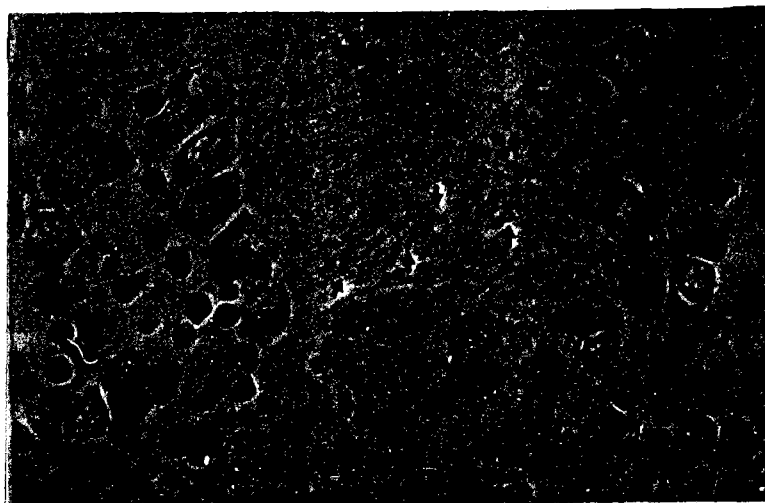
ค

ภาพประกอบ 16 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ
บริเวณตับและตับอ่อนกุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส
หัวเหลือง

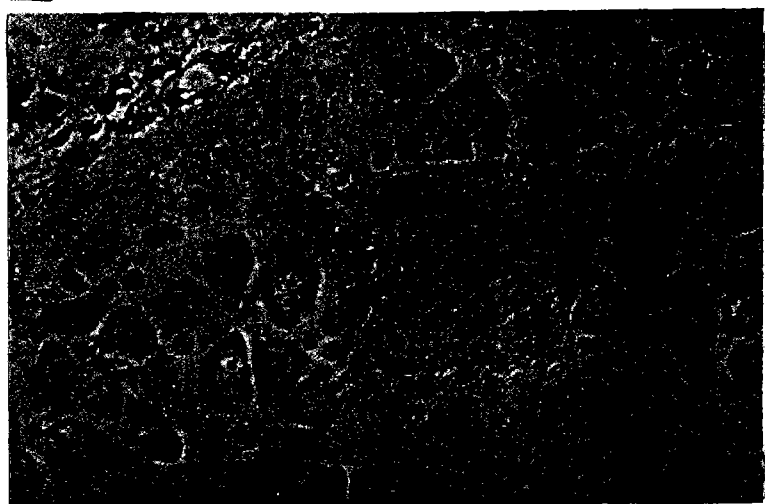
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

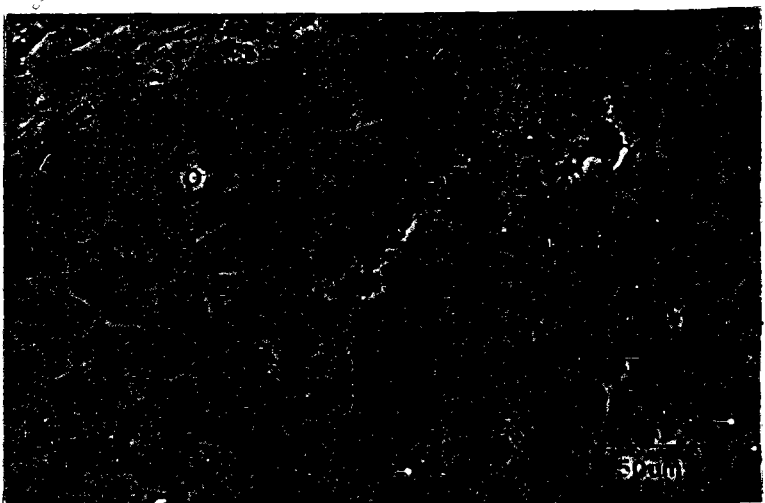
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 17 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ
บริเวณรังไข่กุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B
ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



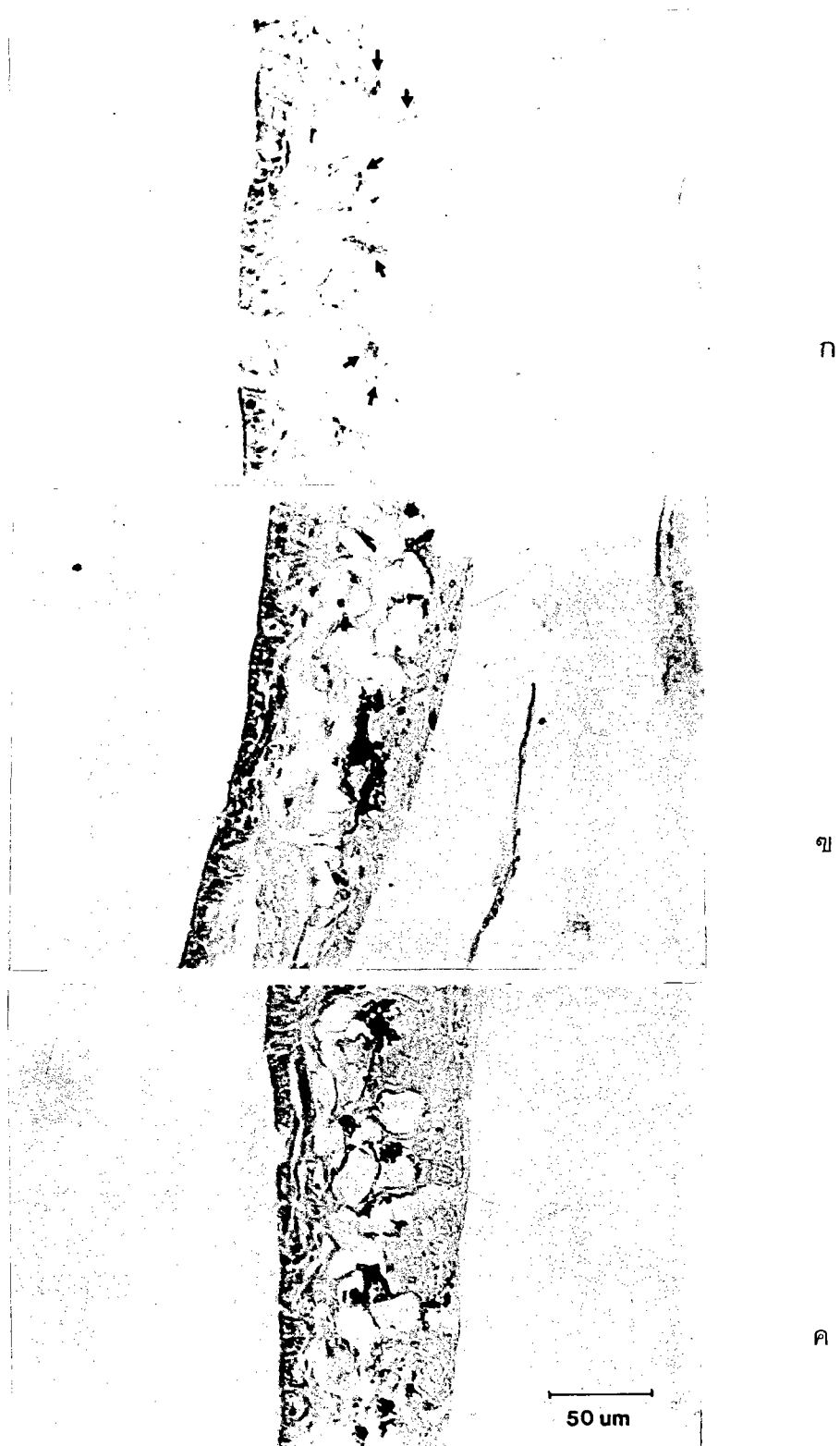
ภาพประกอบ 18 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณอวัยวะ (T) กุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ภาพประกอบ 19 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณเนื้อเยื่อ

บุผิวใต้เปลือกกุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก

ข

ค

ภาพประกอบ 20 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

หัวใจกุ้ง *Palaemon styliiferus* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

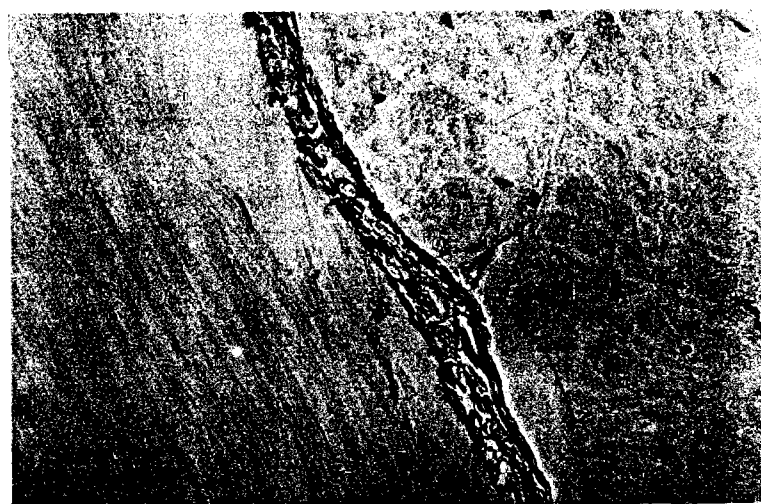
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

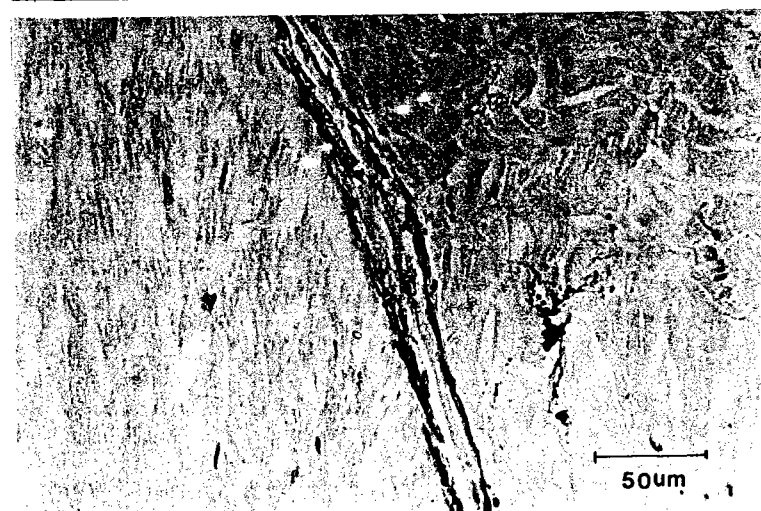
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 21 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

กล้ามเนื้อของ *Palaemon styliferus* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

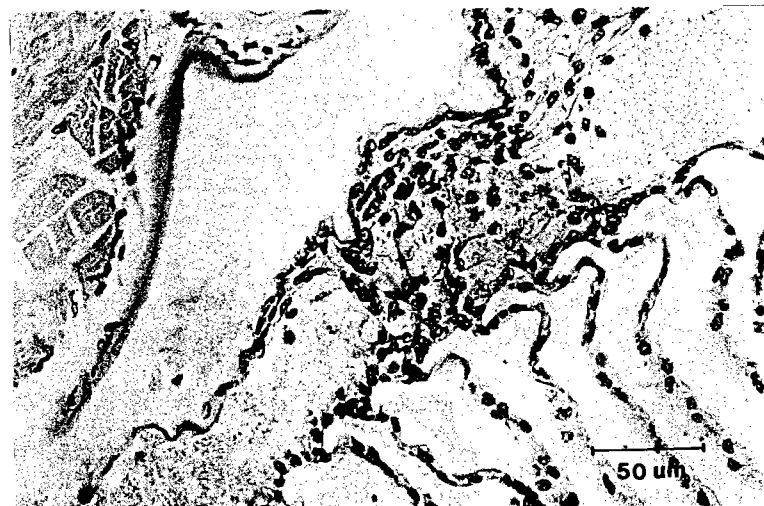
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

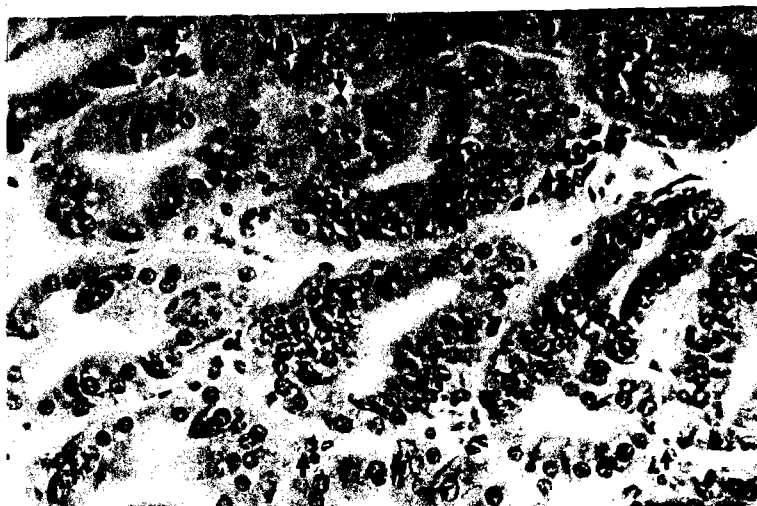
ภาพประกอบ 22 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณเหงือกกุ้ง *Palaemon styliiferus* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

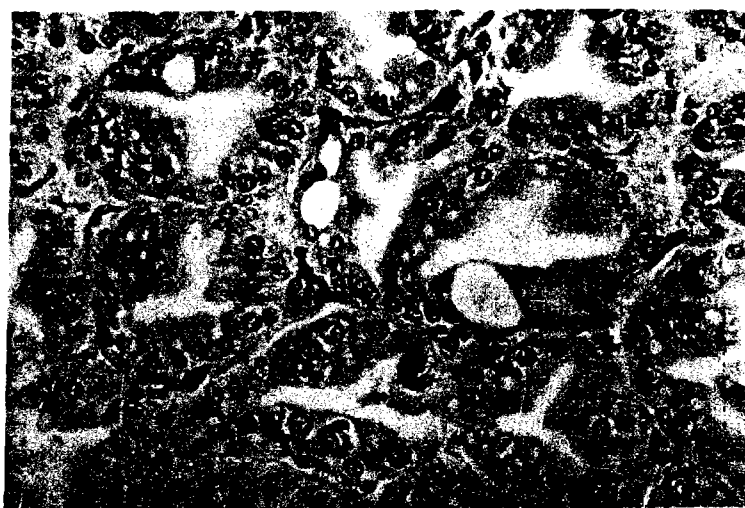
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

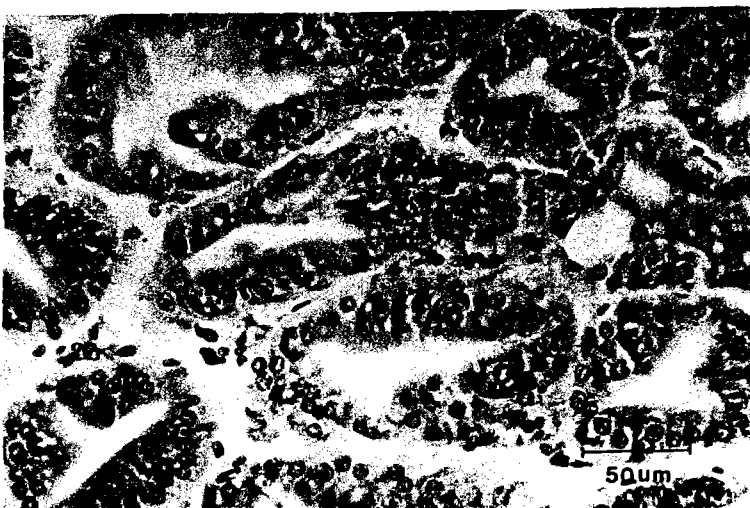
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

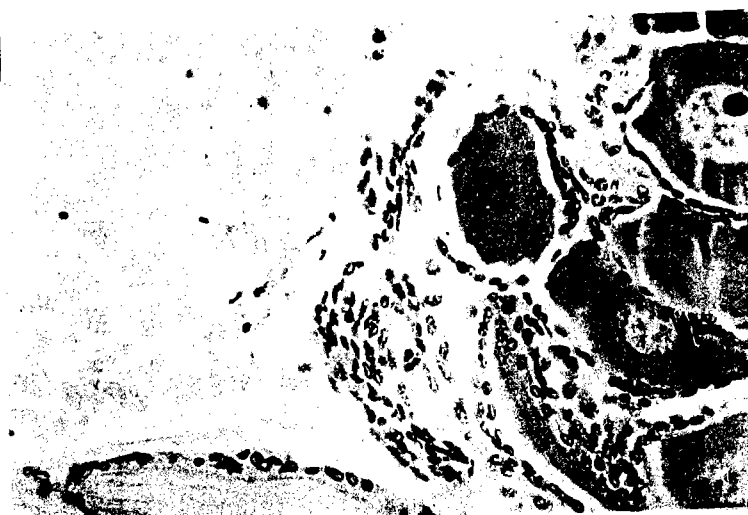
ภาพประกอบ 23 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณตับและตับอ่อนกุ้ง *Palaemon styliferus* ที่ฉีดเชื่อไวรัสหัวเหลือง

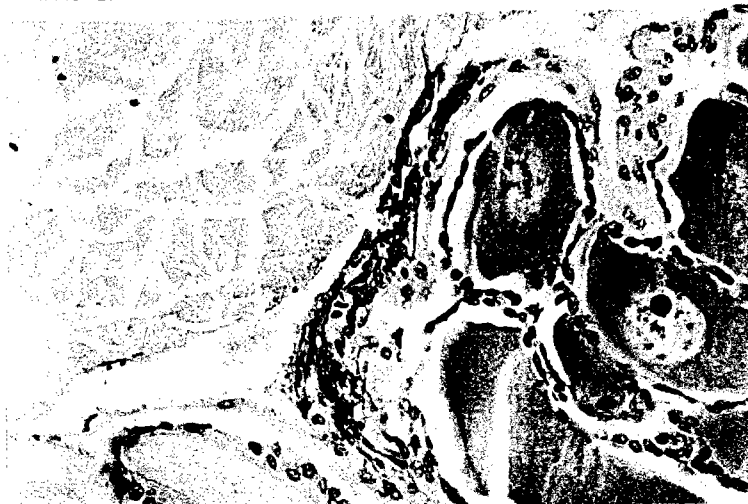
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

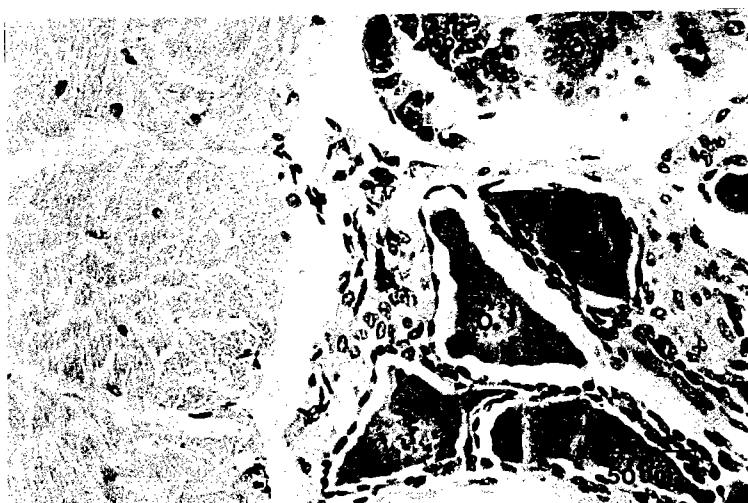
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 24 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณรังไข่ (0= oocyte) กุ้ง *Palaemon styliferus* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

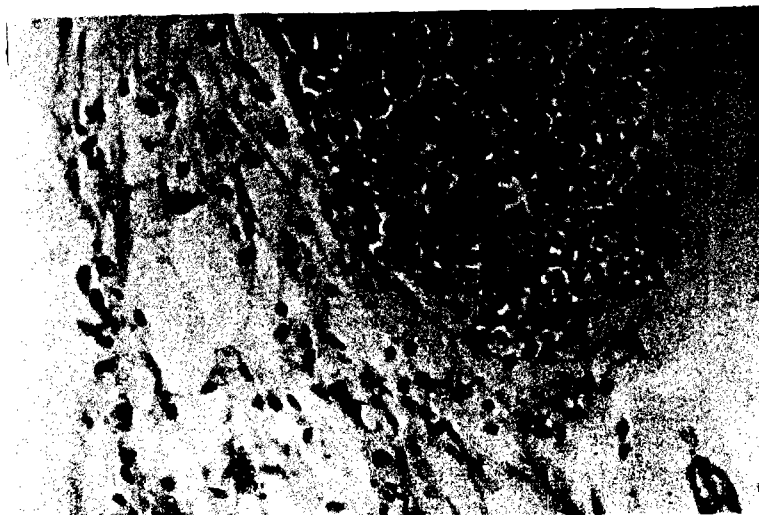
ภาพประกอบ 25 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ

เนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือกกุ้ง *Palaemon styliferus* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

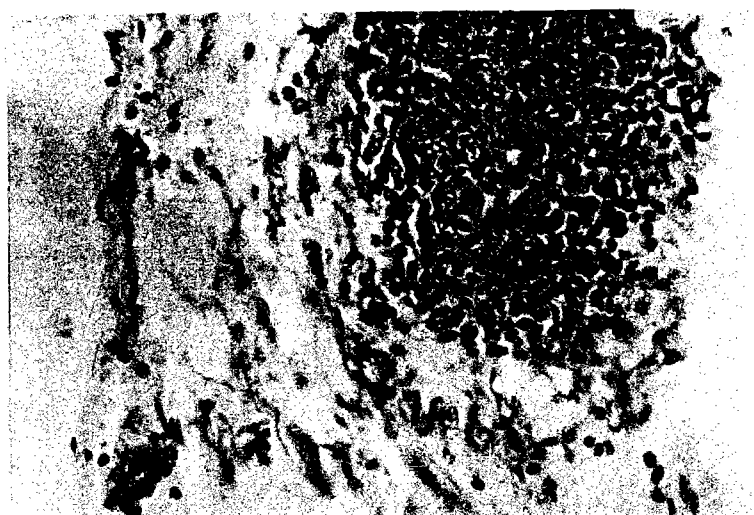
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

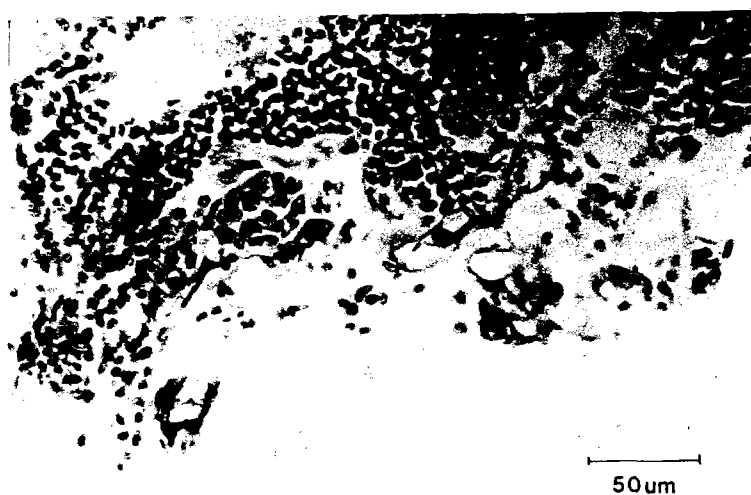
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

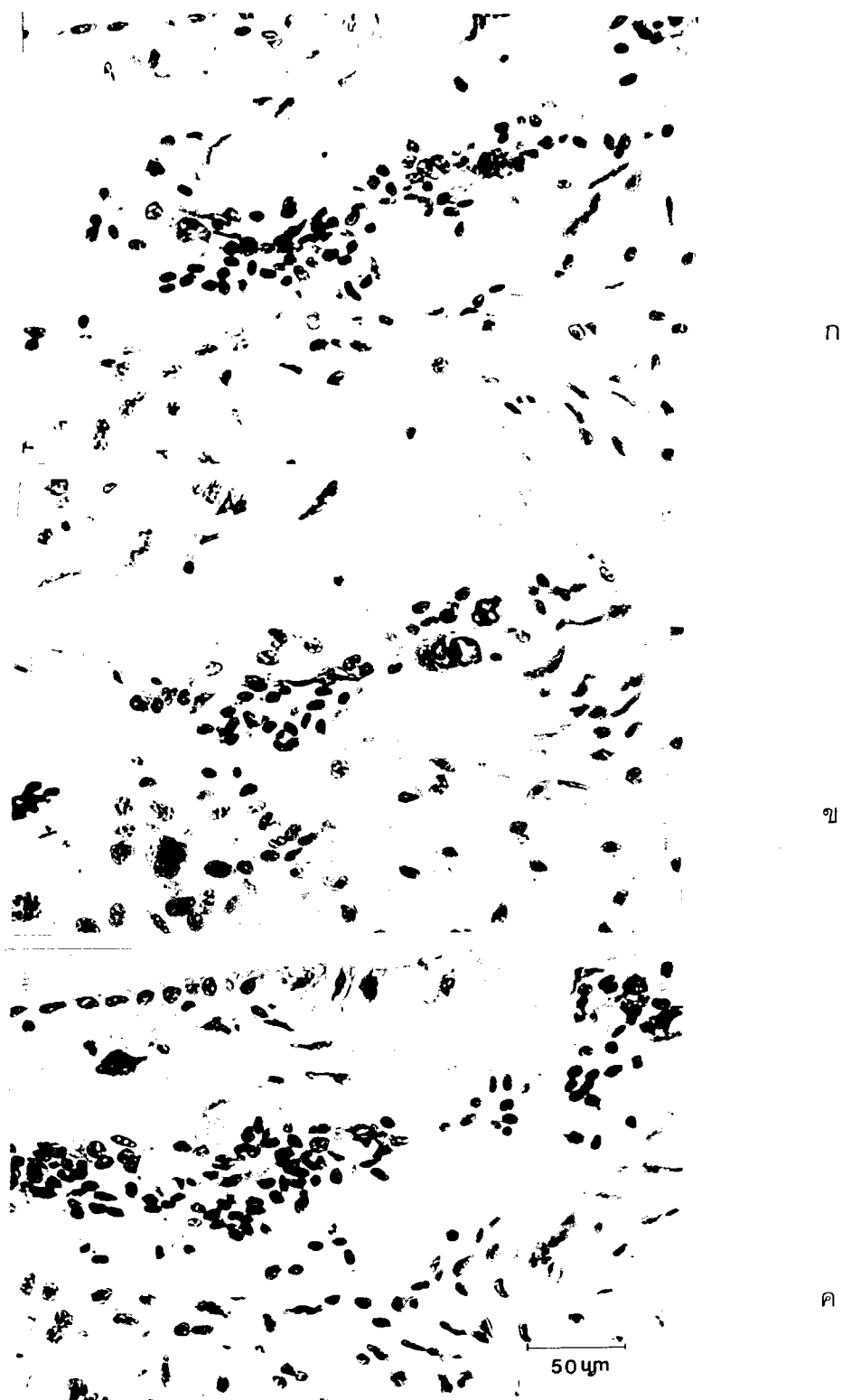
ภาพประกอบ 26 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ

เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดกึ่ง *Palaemon styliiferus* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ภาพประกอบ 27 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณหัวใจกุ้ง *Macrobrachium sintangense* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

- โดยใช้ ก = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B
 ข = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D
 ค = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก

ข

ค

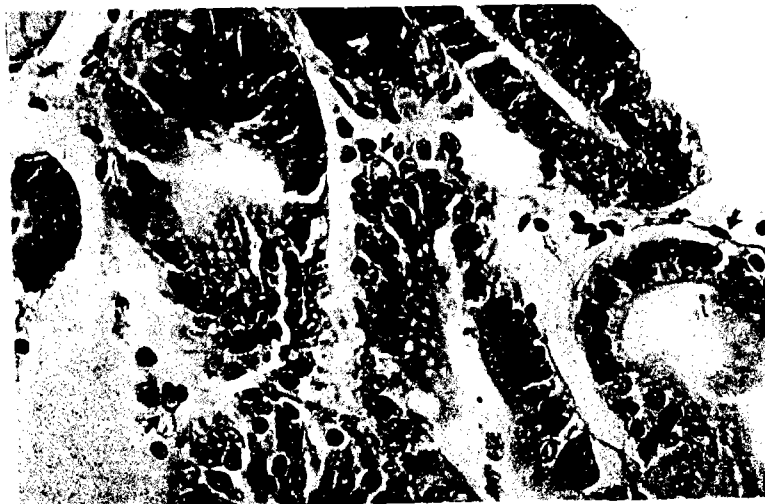
ภาพประกอบ 28 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณกล้ามเนื้อของ *Macrobrachium sintangense* ที่ฉีดเชื่อไวรัสหัวเหลือง

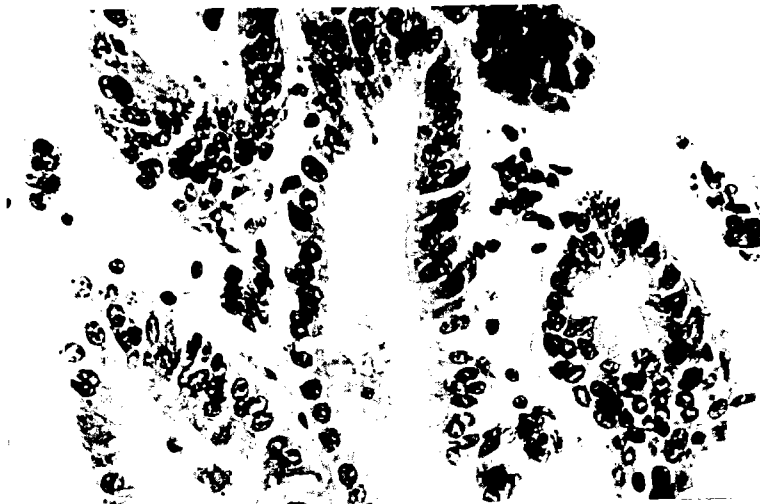
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

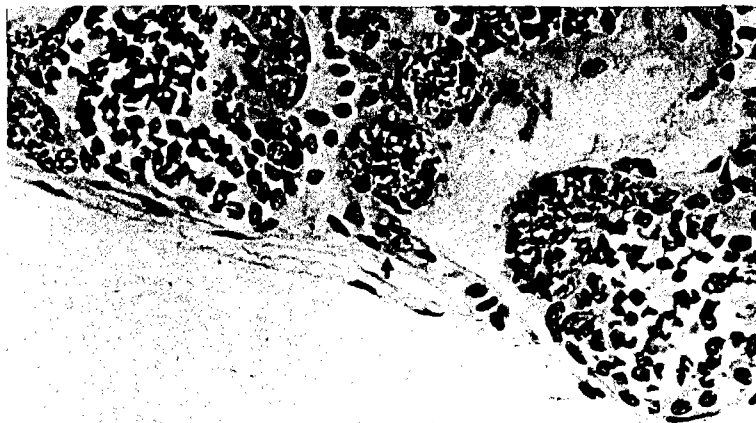
ภาพประกอบ 29 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณตับและตับอ่อนกุ้ง *Macrobrachium sintangense* ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

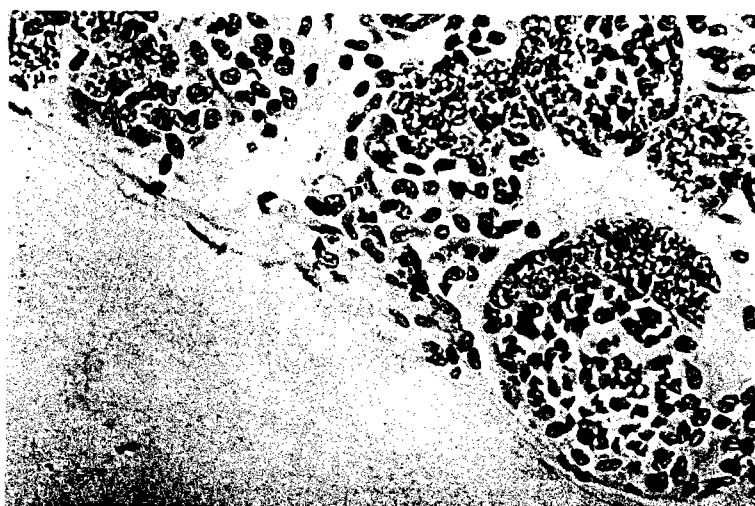
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 30 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

อวัยวะ (T) กุ้ง *Macrobrachium sintangense* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



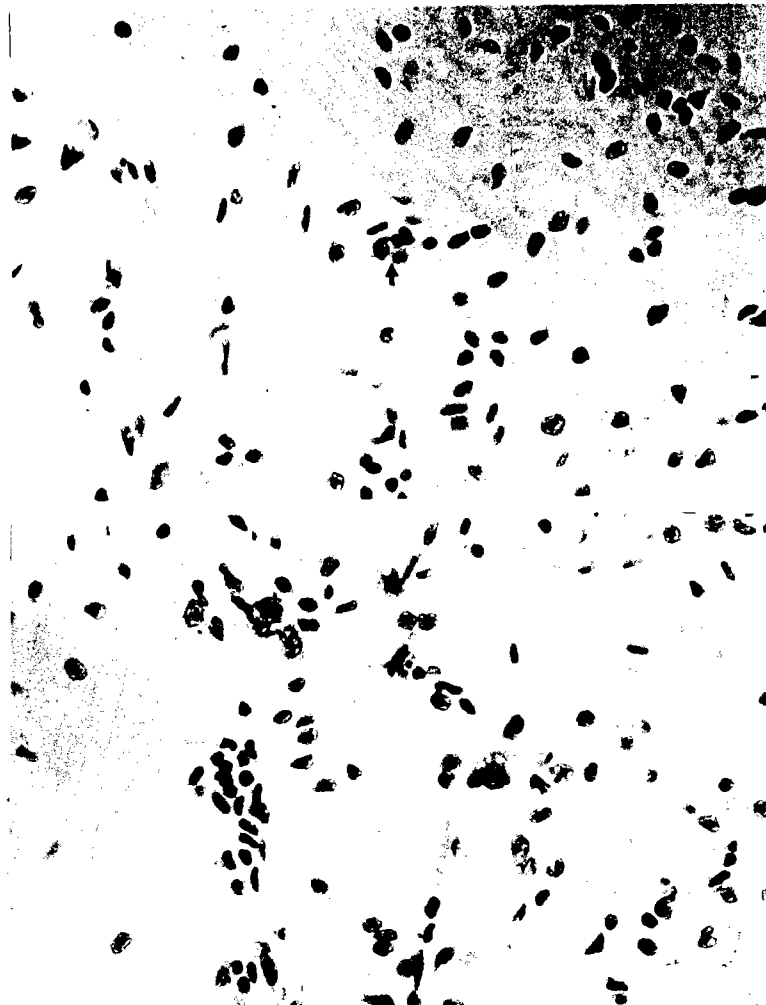
ค

ภาพประกอบ 31 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ
เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือกกุ้ง *Macrobrachium sintangense* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

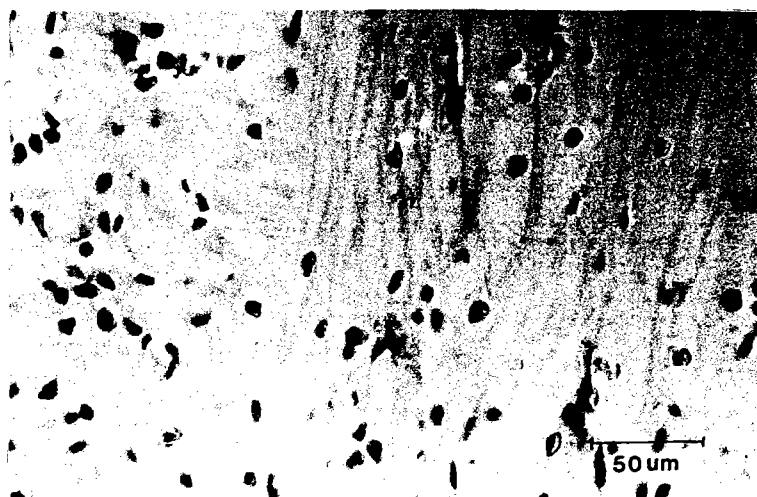
ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก

ข



ค

ภาพประกอบ 32 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

หัวใจกุ้ง *Macrobrachium lanchesteri* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

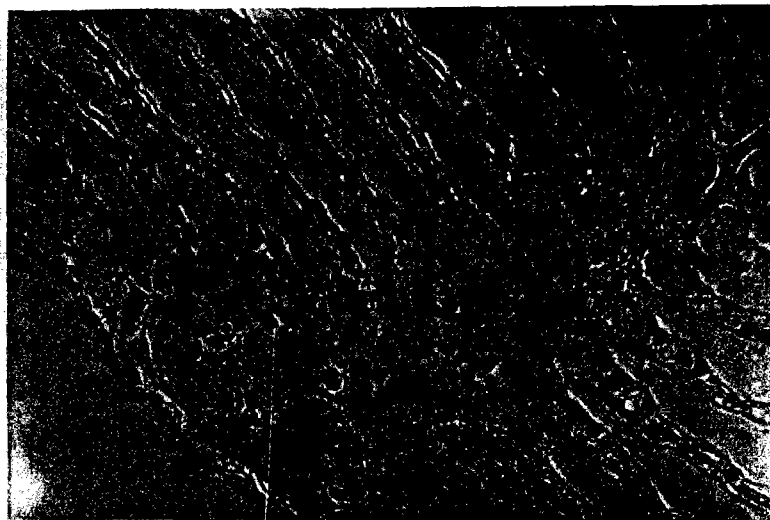
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



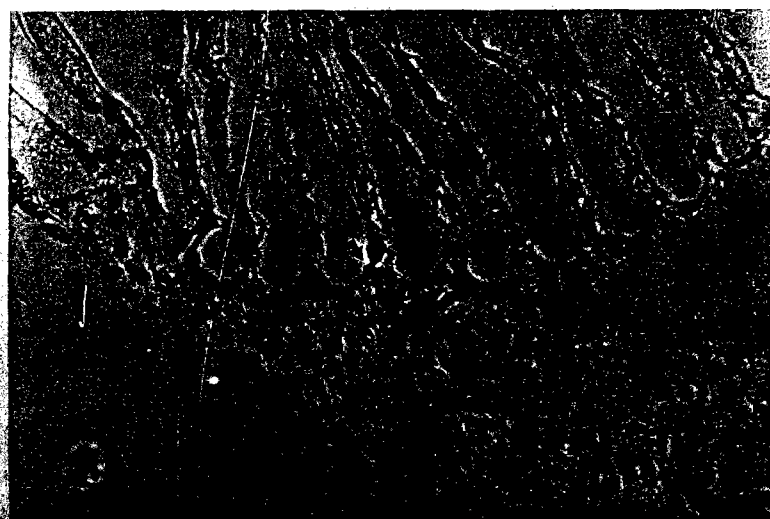
ภาพประกอบ 33 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณกล้ามเนื้อของ *Macrobrachium lanchester* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

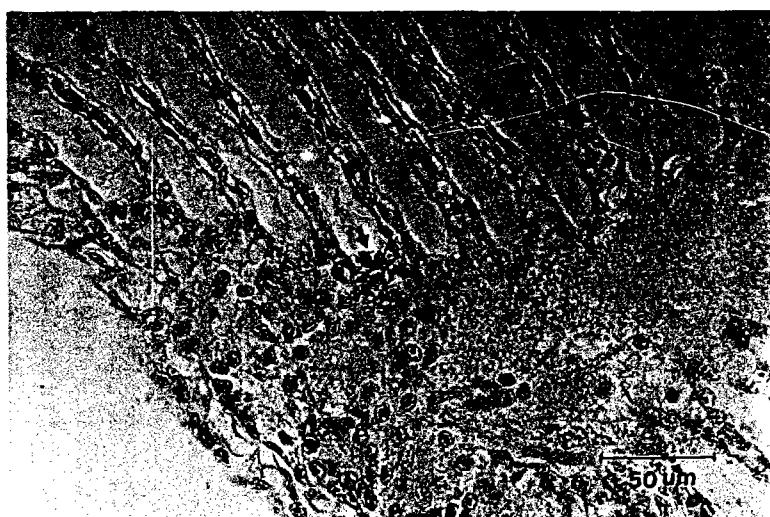
- โดยใช้
- ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B
 - ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D
 - ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

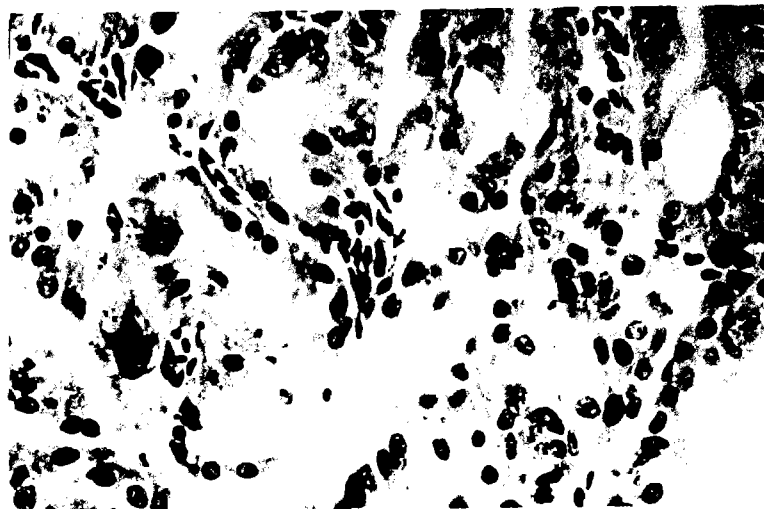
ภาพประกอบ 34 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณเหงือกกุ้ง *Macrobrachium lanchesteri* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

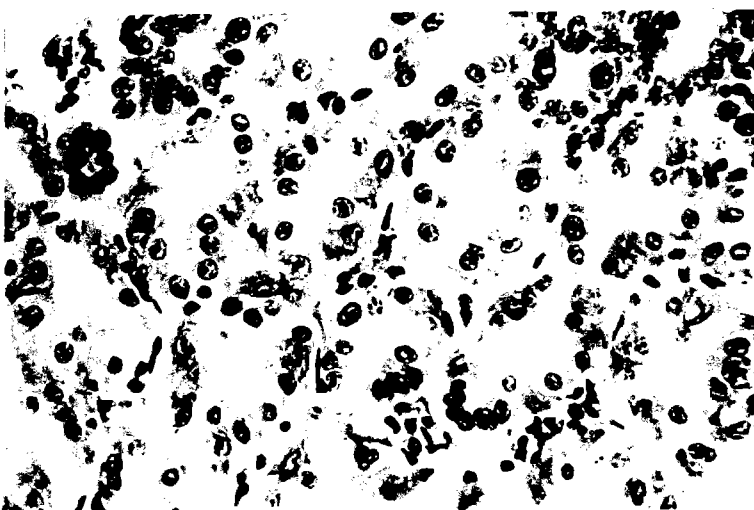
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ไม่พบ immunoreactivity

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

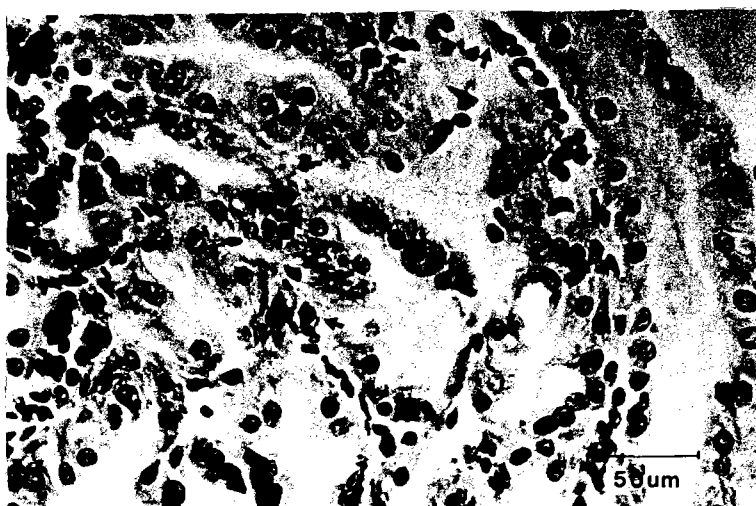
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

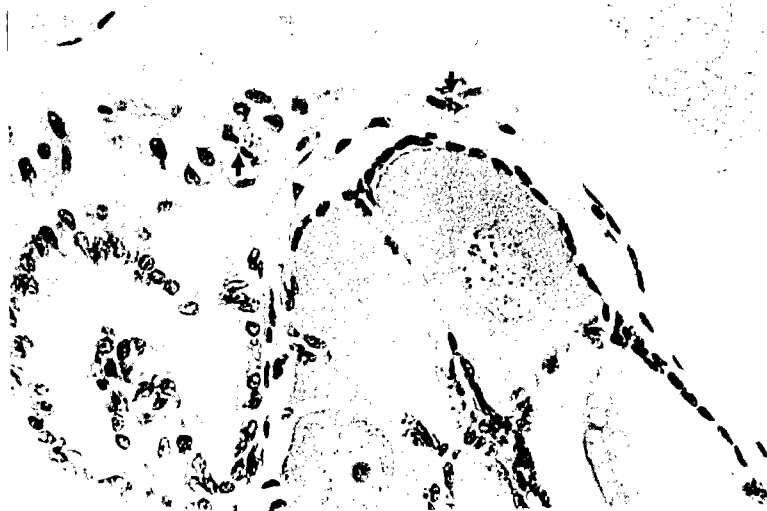
ภาพประกอบ 35 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณตับและตับอ่อนกุ้ง *Macrobrachium lanchesteri* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

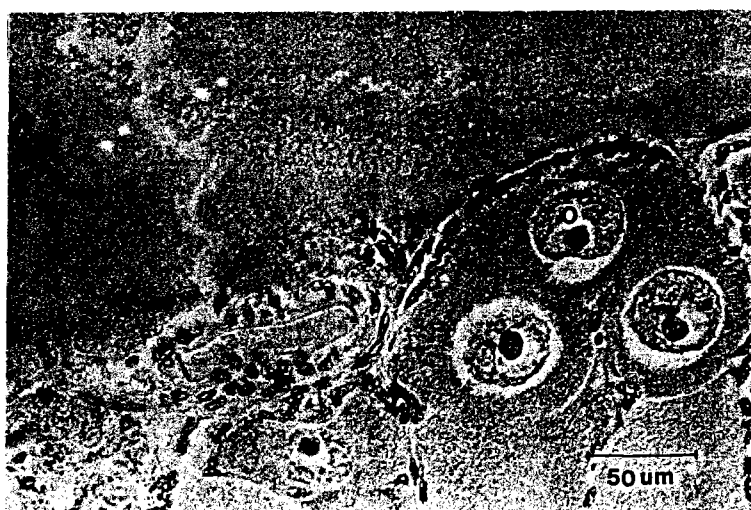
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก

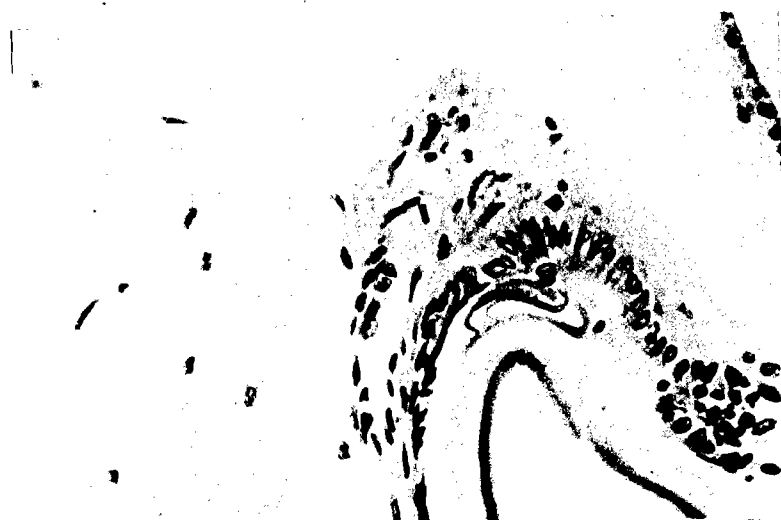


ข



ค

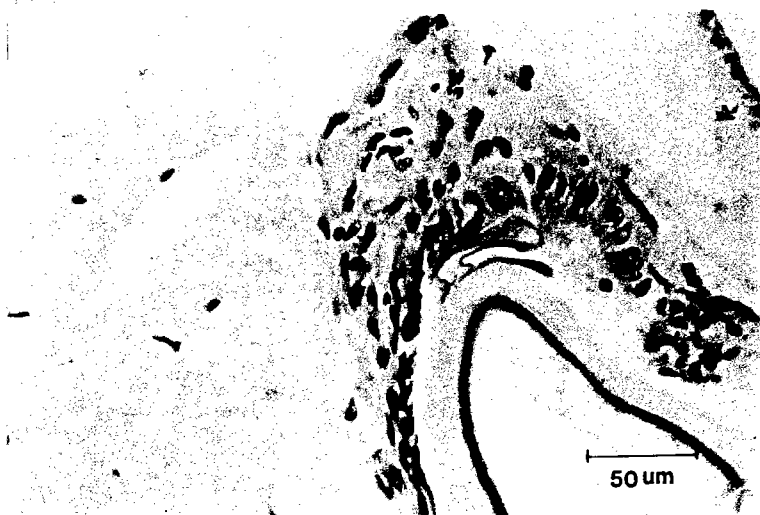
ภาพประกอบ 36 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ
บริเวณรังไข่ (O= oocyte) กุ้ง *Macrobrachium lanchesteri* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
โดยใช้ ก = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B
 ข = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D
 ค = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

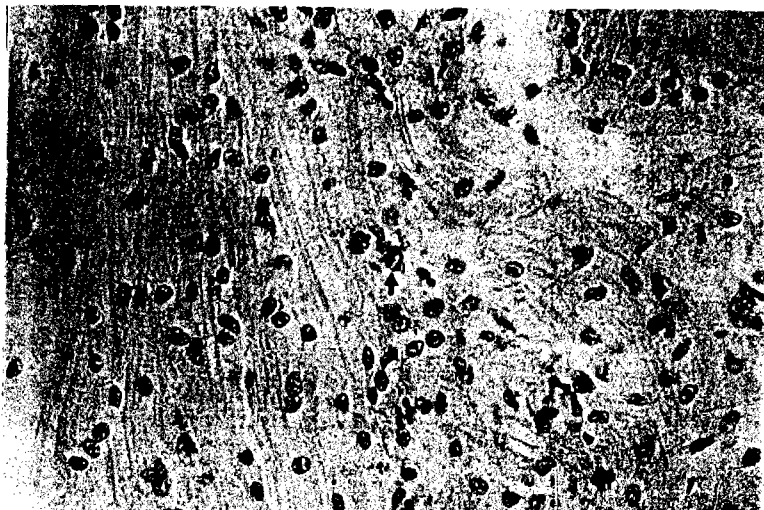
ภาพประกอบ 37 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ

เนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือกกุ้ง *Macrobrachium lanchesteri* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

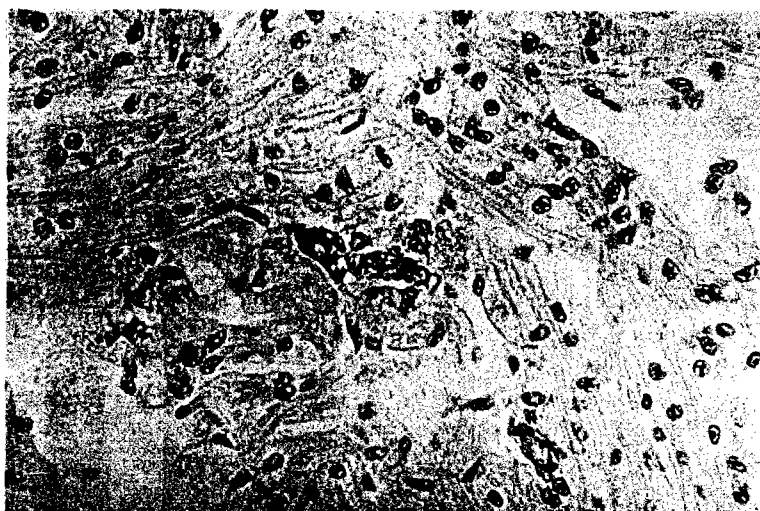
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

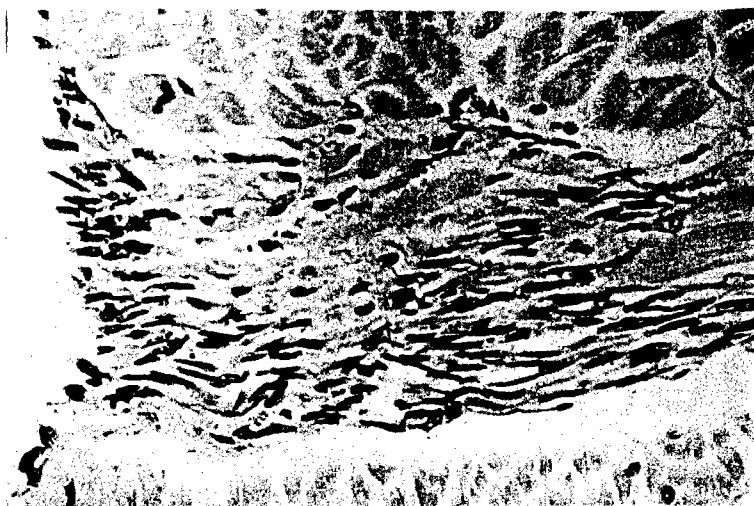
ภาพประกอบ 38 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณหัวใจกึ่ง *Macrobrachium rosenbergii* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

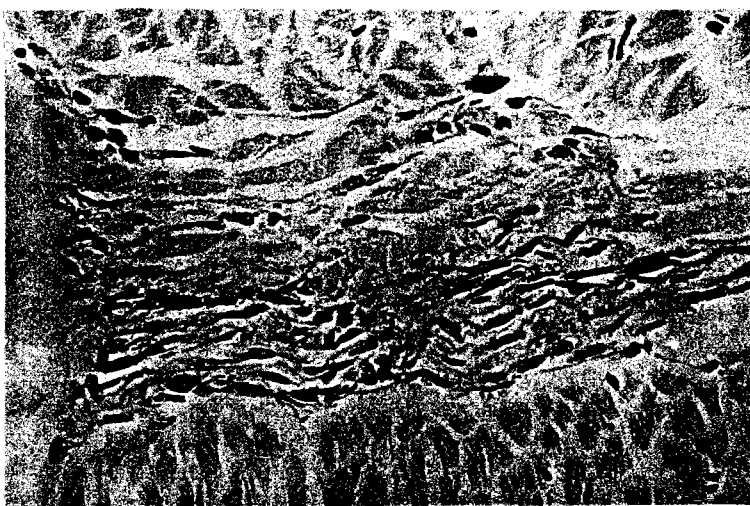
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

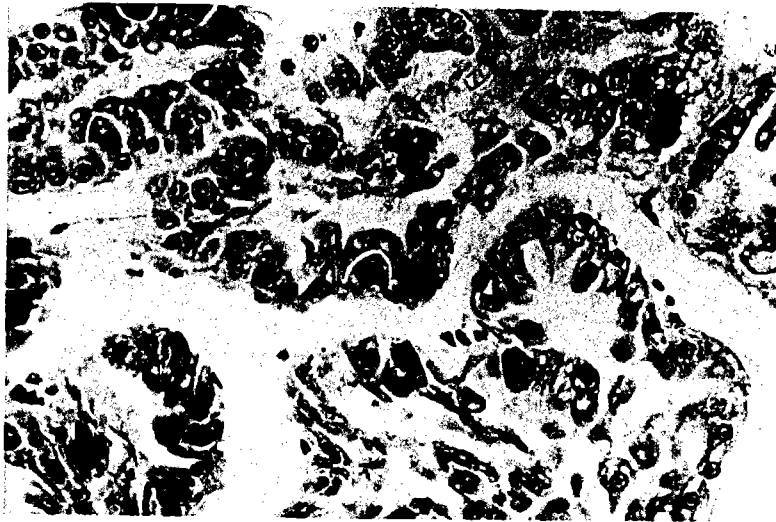
ภาพประกอบ 39 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณกล้ามเนื้อของ *Macrobrachium rosenbergii* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

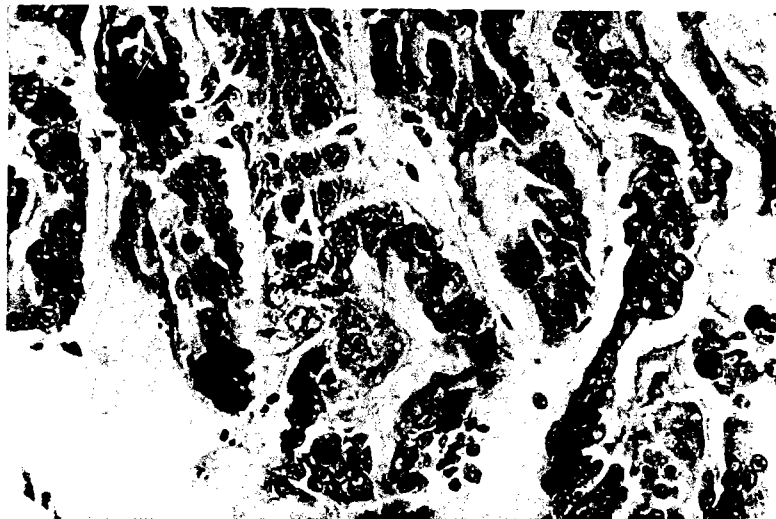
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

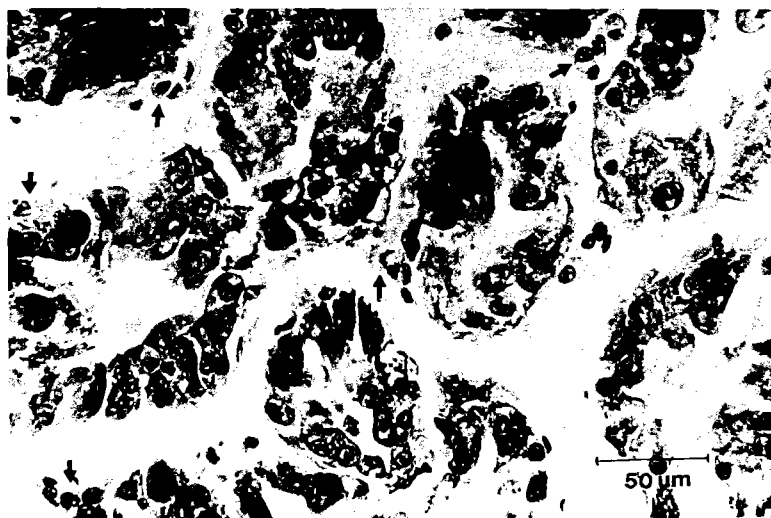
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

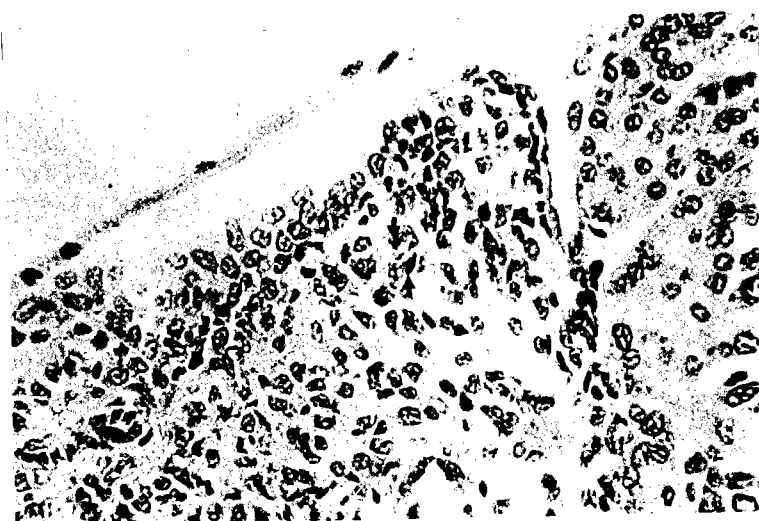
ภาพประกอบ 40 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

ตับและตับอ่อนของ *Macrobrachium rosenbergii* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

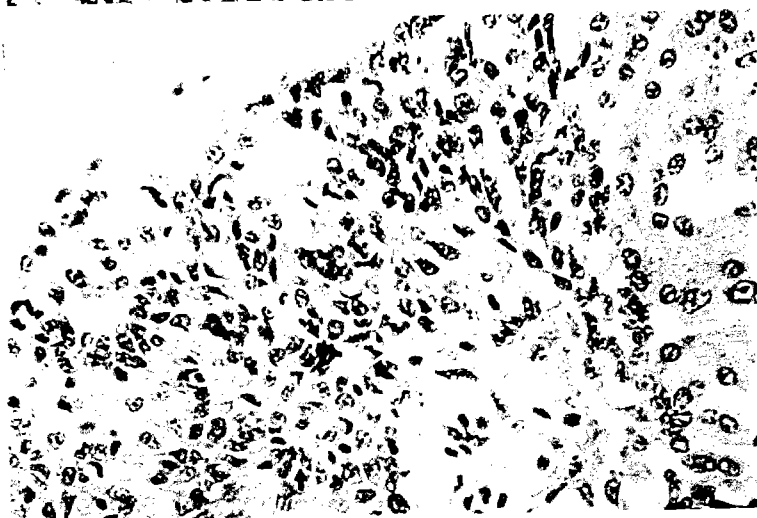
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ไม่พบ immunoreactivity

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

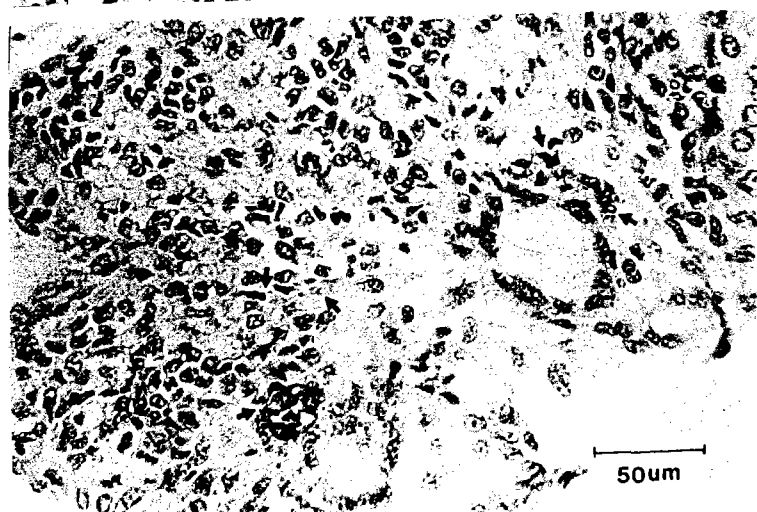
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 41 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณ antennal gland กุ้ง *Macrobrachium rosenbergii* ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

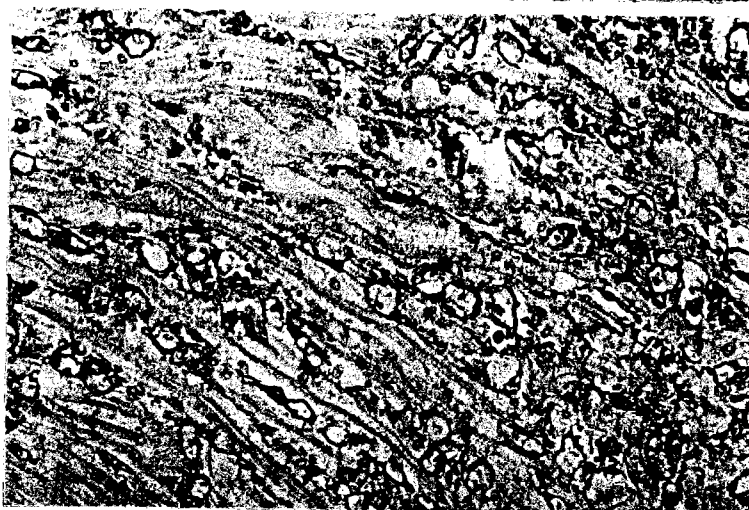
โดยใช้ ก = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

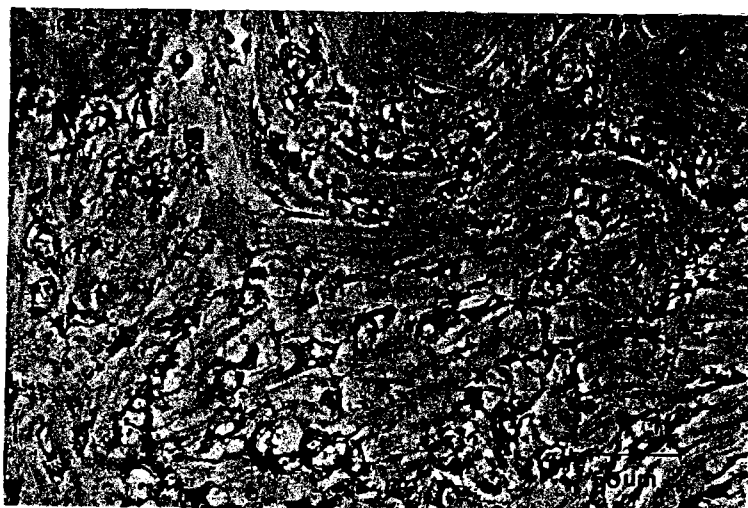
ค = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

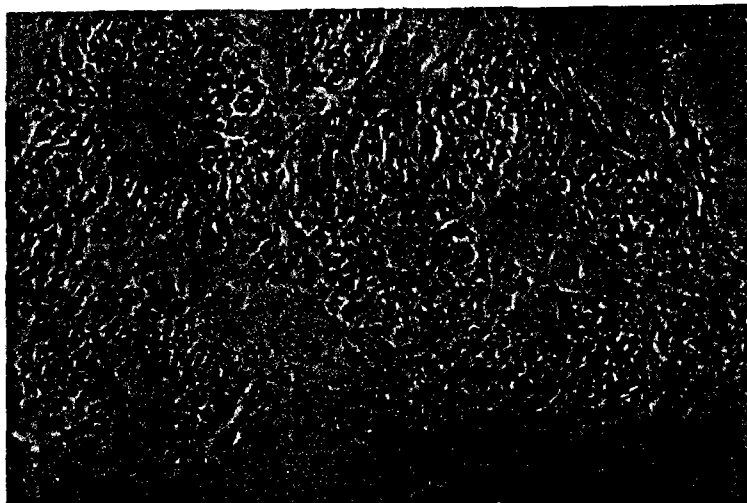
ภาพประกอบ 42 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

หัวใจกุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

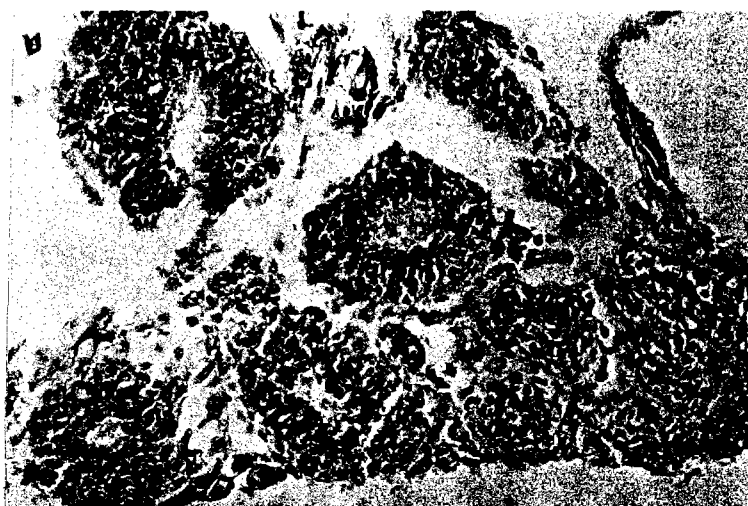
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

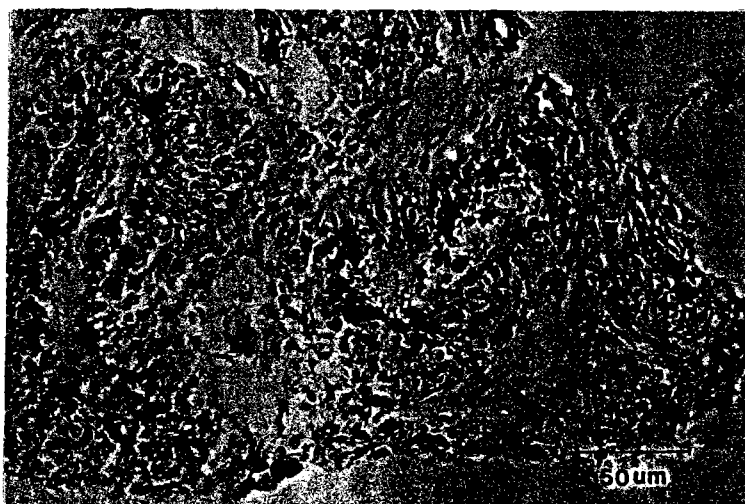
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 43 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณอวัยวะน้ำเหลืองกึ่ง *Metapenaeus affinis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

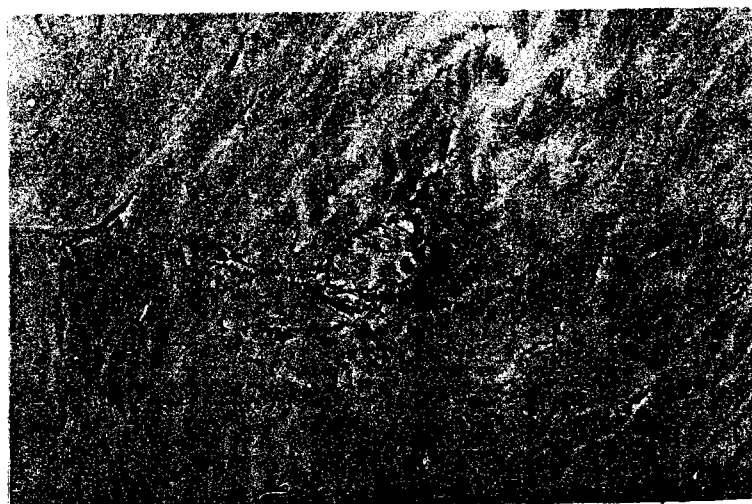
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

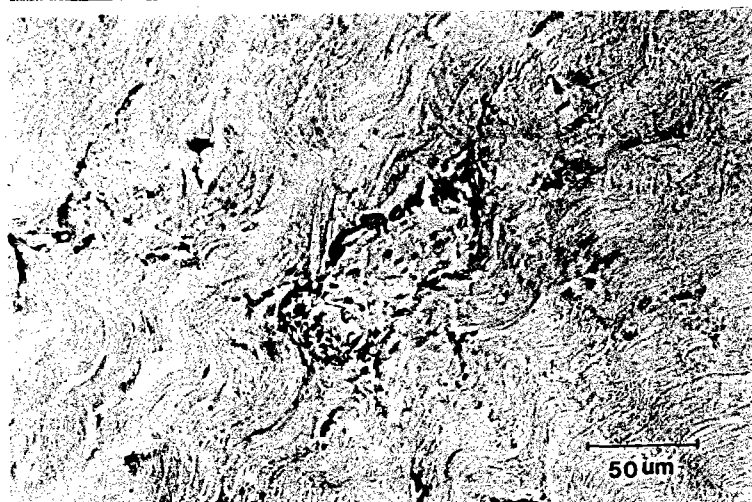
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

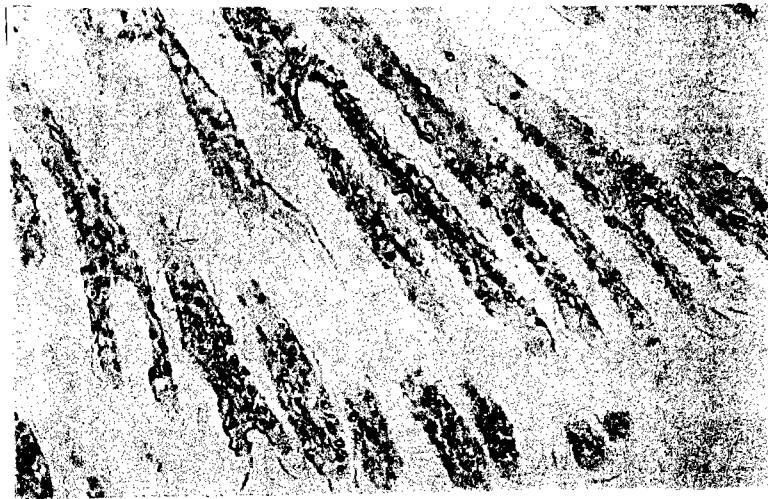
ภาพประกอบ 44 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณกล้ามเนื้อของ *Metapenaeus affinis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

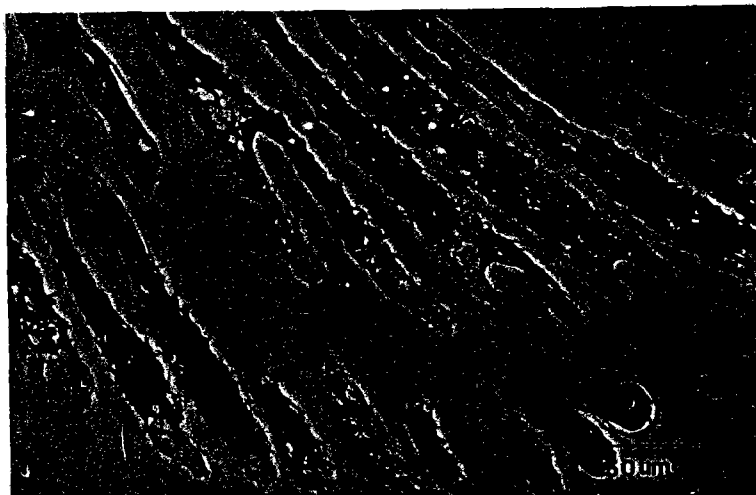
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 45 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

เหงือกกุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

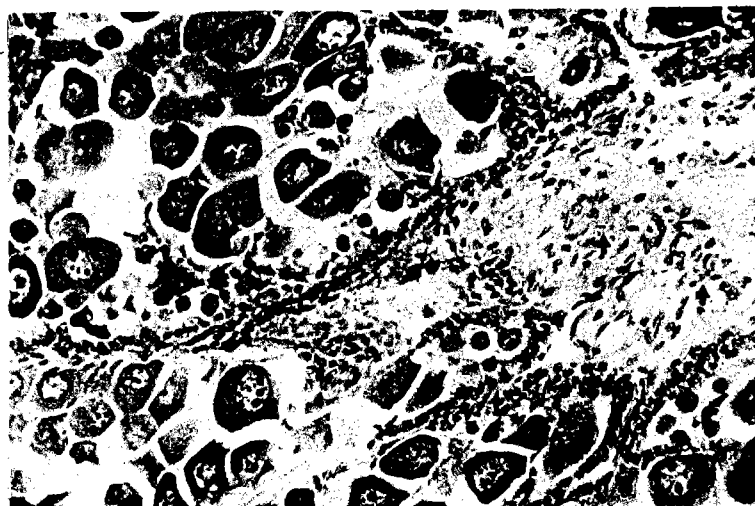
ภาพประกอบ 46 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณตับและตับอ่อนกุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

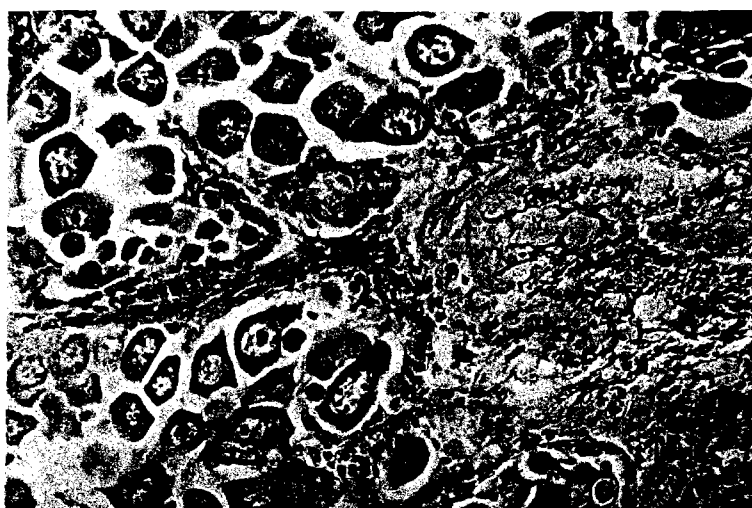
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

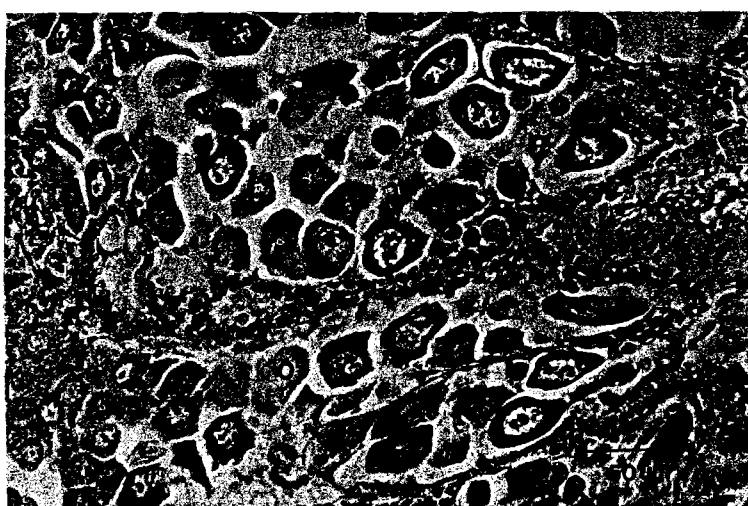
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 47 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณรังไข่ (O= oocyte) กุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

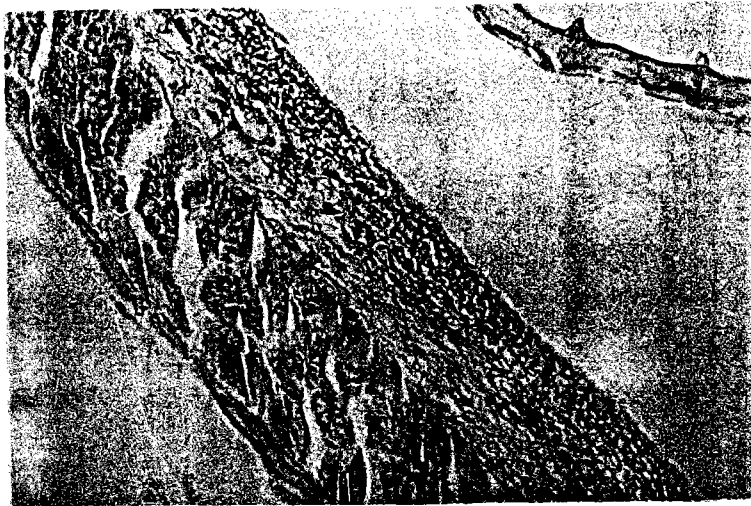
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

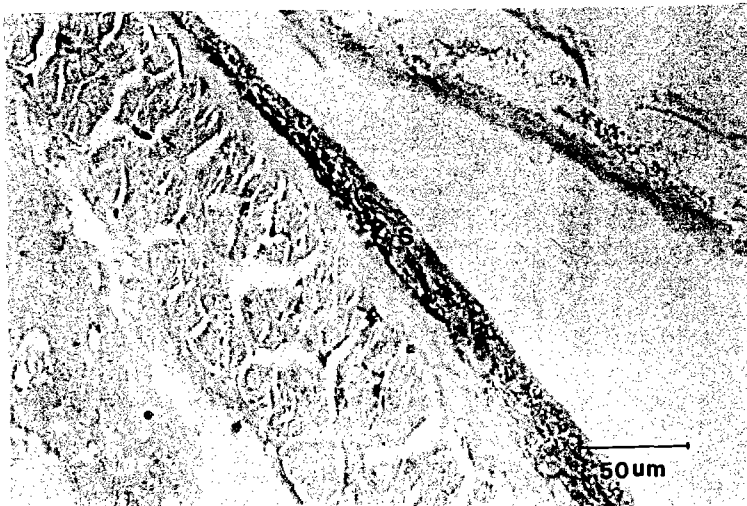
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

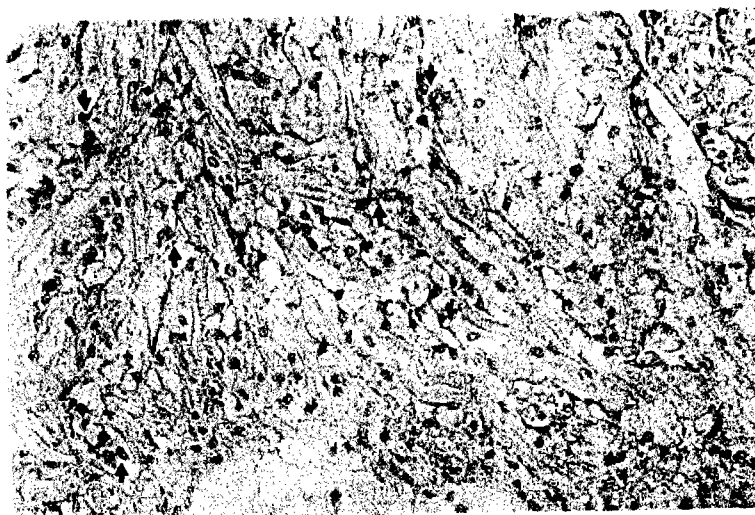
ภาพประกอบ 48 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ

เนื้อเยื่อปูผิวดำเปลือก (S) กุ้ง *Metapenaeus affinis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

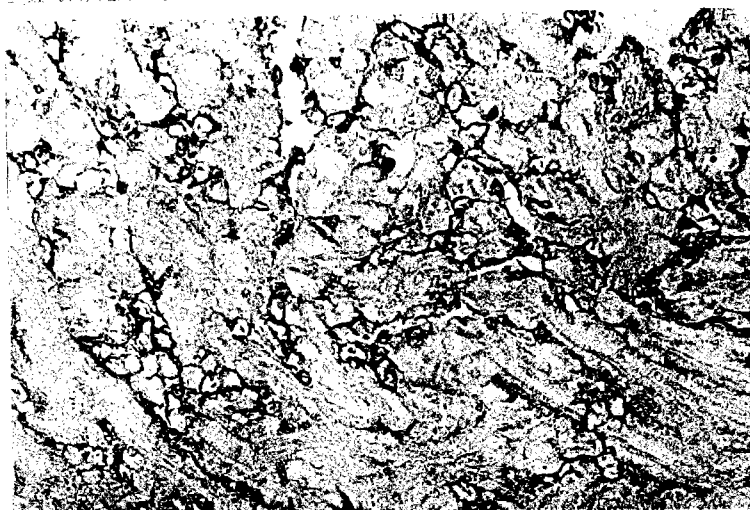
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

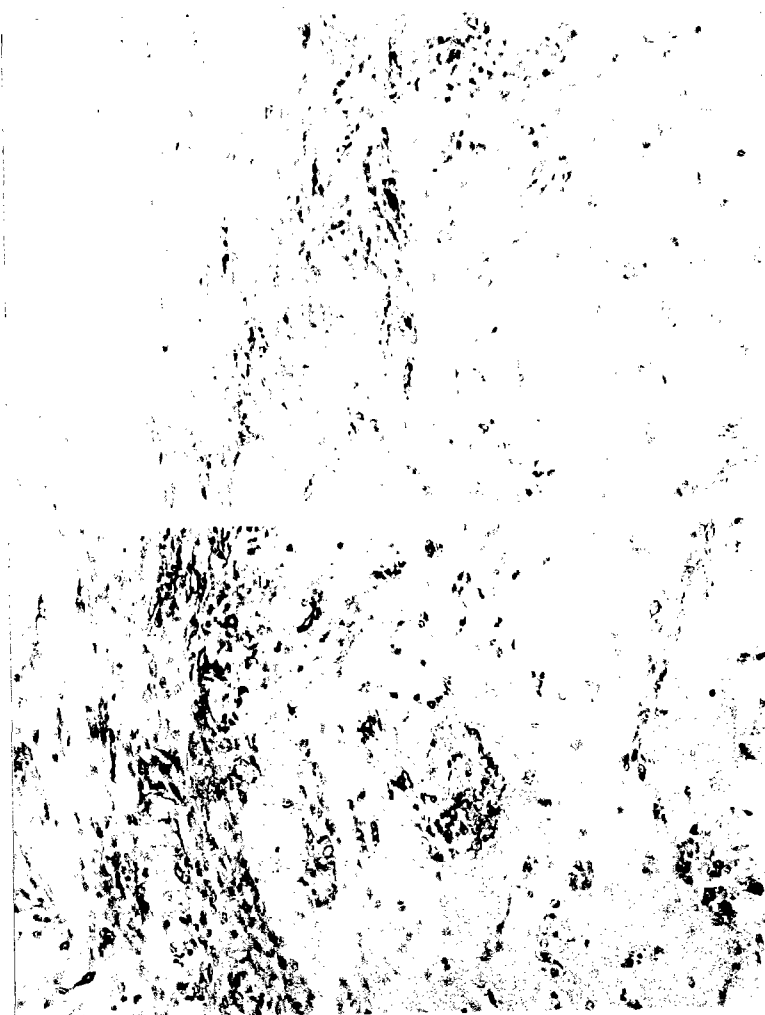
ภาพประกอบ 49 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณหัวใจกุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก

ข



ค

ภาพประกอบ 50 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

ปมประสาท (N) กุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

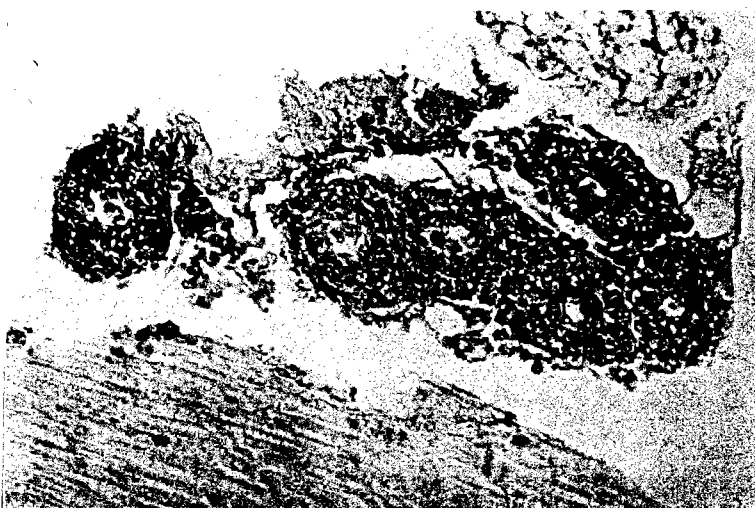
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

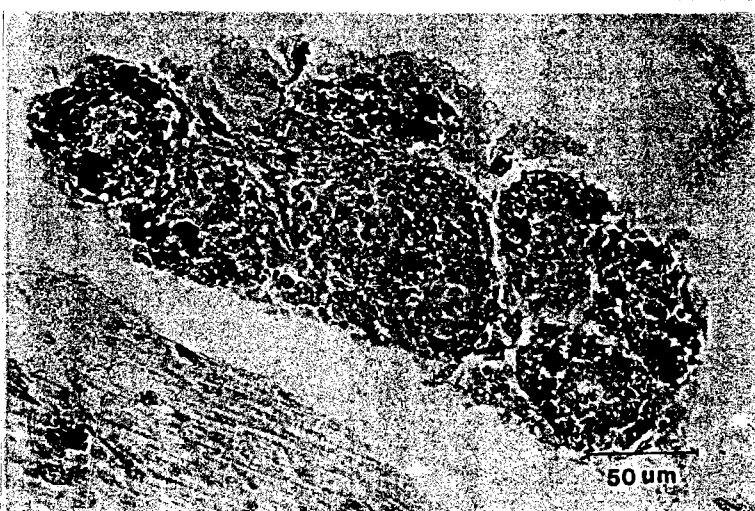
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก

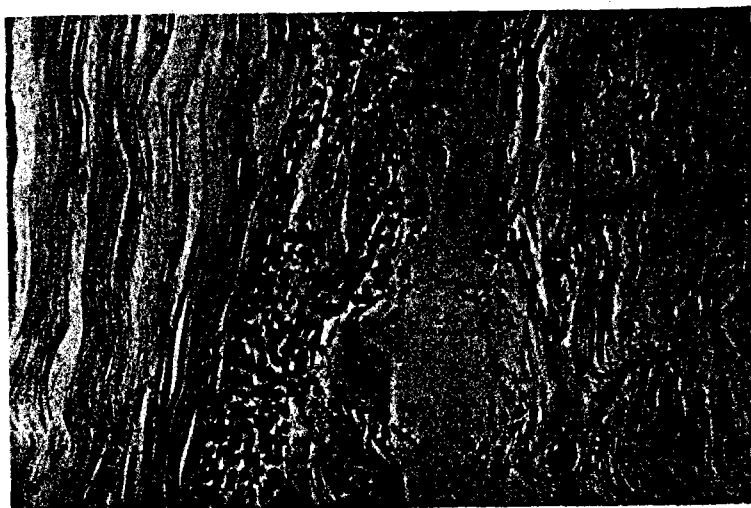


ข

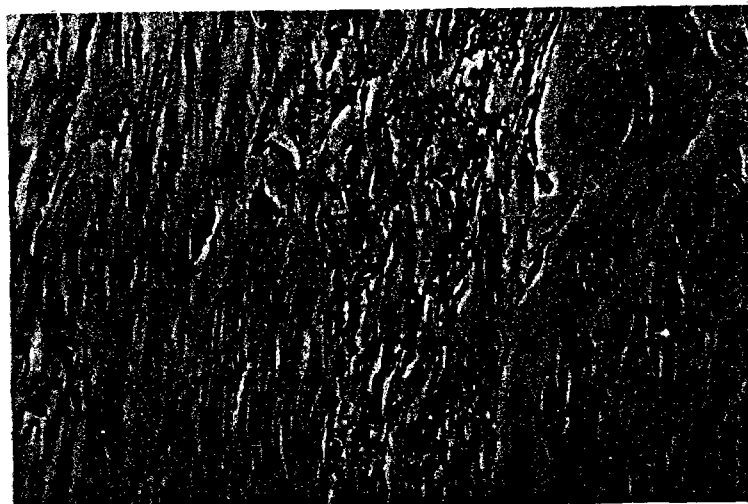


ค

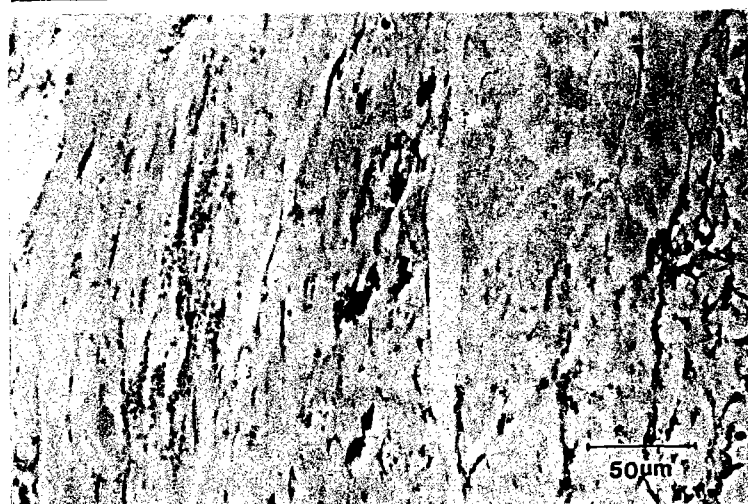
ภาพประกอบ 51 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ
บริเวณอวัยวะน้ำเหลืองกุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B
 ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D
 ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

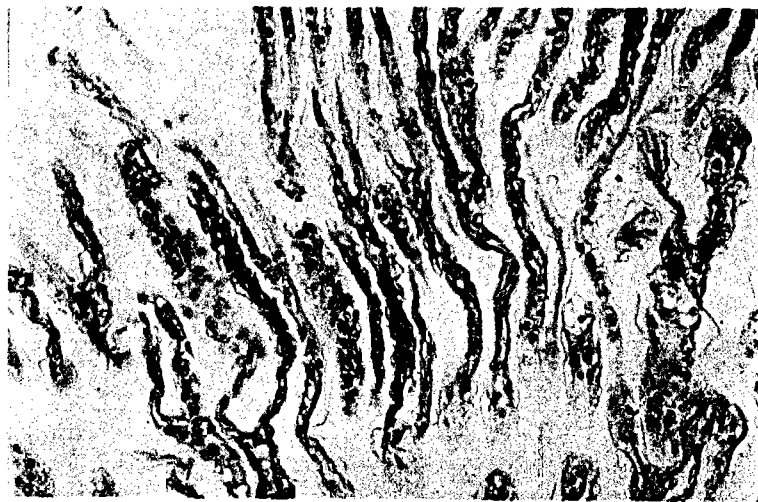
ภาพประกอบ 52 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณกล้ามเนื้อกุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

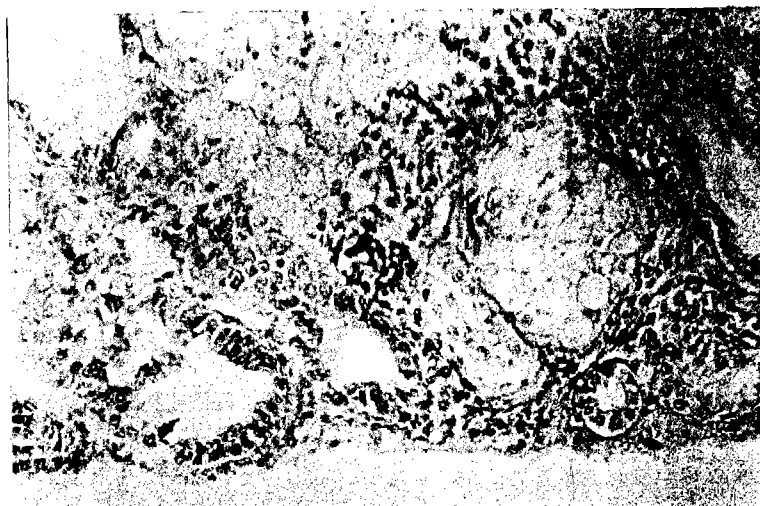
ภาพประกอบ 53 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณเหงือก กุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

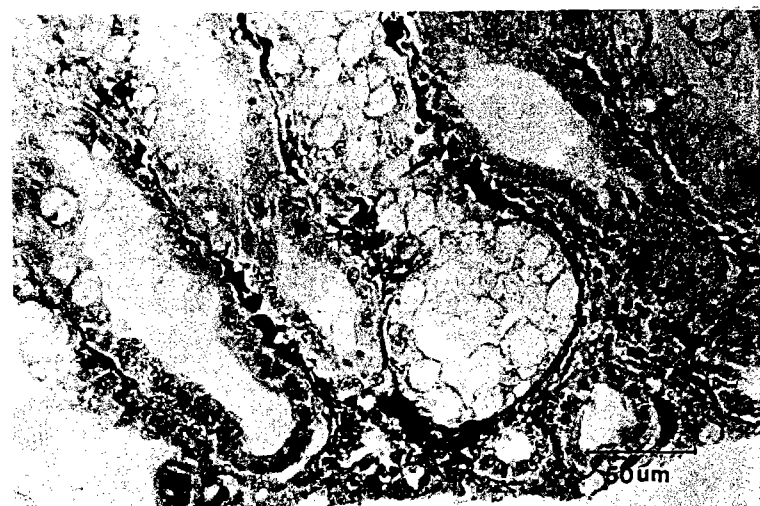
ค = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

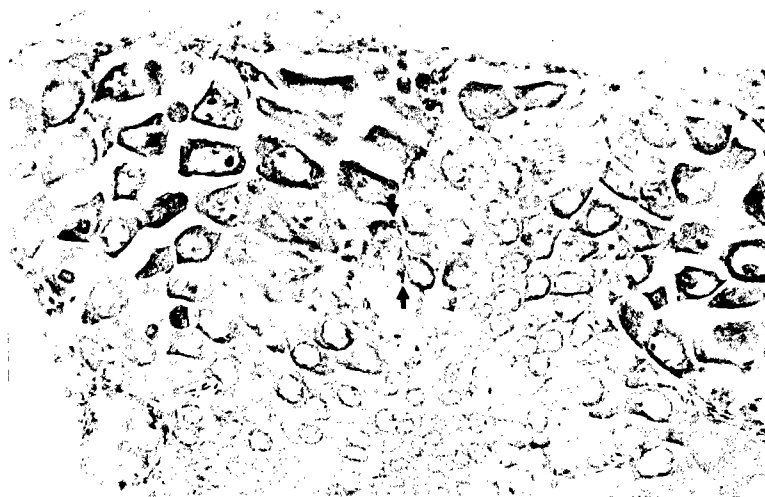
ภาพประกอบ 54 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณตับและตับอ่อนกุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื่อไวรัสหัวเหลือง

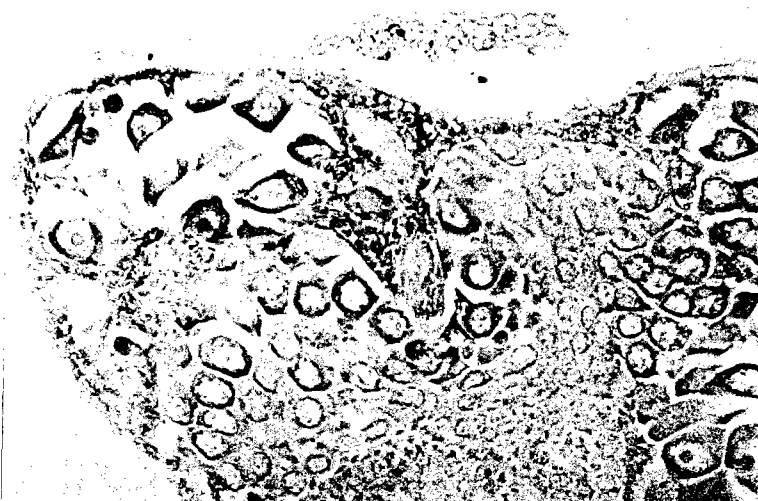
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

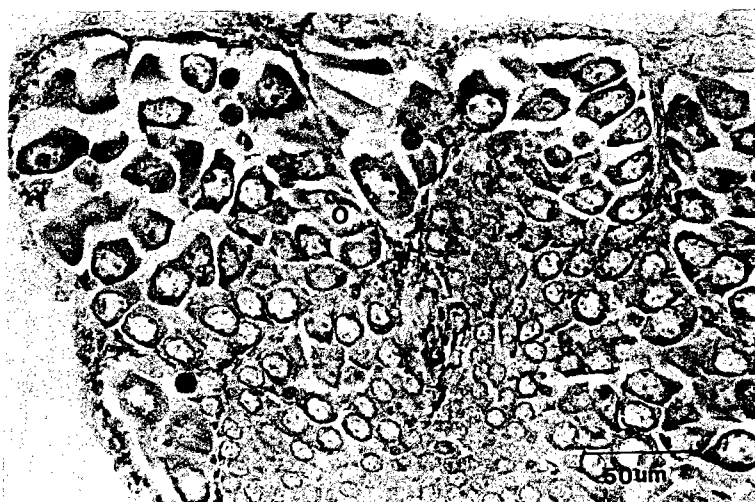
ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 55 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อ

บริเวณรังไข่ (O= oocyte) กุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

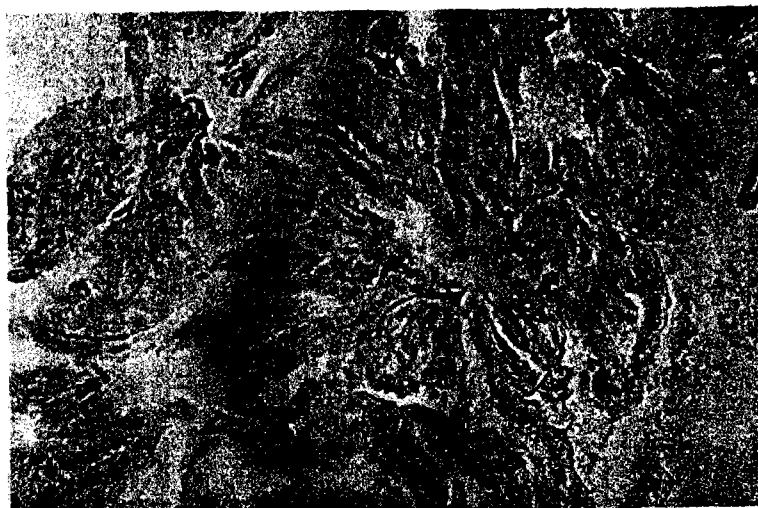
ภาพประกอบ 56 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

อวัยวะ (T) กุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

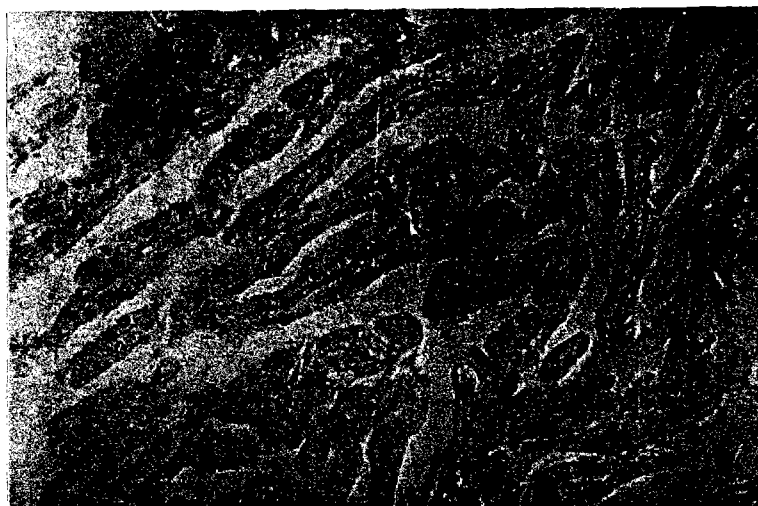
โดยใช้ ก = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

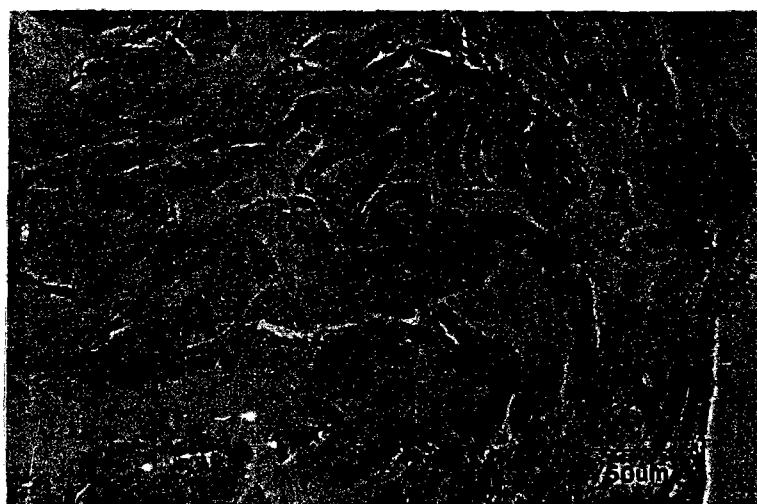
ค = ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 57 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณ

antennal gland กุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19



ก



ข



ค

ภาพประกอบ 58 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของบริเวณ
เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก (S) กุ้ง *Metapenaeus brevicornis* ที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
โดยใช้ ก = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B
 ข = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D
 ค = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

จากการรวบรวมกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* กุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* และกุ้งในวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ *Caridina sp.* สามารถพบกุ้งชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ปะปนอยู่เป็นจำนวนมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากภายในบ่อกุ้งมีอาหารอุดมสมบูรณ์ วงจรสืบพันธุ์ของกุ้งเหล่านี้ค่อนข้างสั้น และกุ้งสามารถแพร่พันธุ์ได้เองตามธรรมชาติ ส่วนกุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* พบมากในป่าชายเลน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

กุ้งในวงศ์ Palaemonidae สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ด้วยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันในกุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งกะต้อม *Macrobrachium sintangense* โดยพบในเนื้อเยื่อกุ้งบริเวณต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ กล้ามเนื้อเหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อัณฑะ antennal gland เนื้อเยื่อปูผิวได้เปลือก และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด แสดงว่า กุ้งในวงศ์ Palaemonidae โดยเฉพาะ *P. styliferus* และ *M. sintangense* มีความสามารถในการเป็นพาหะเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ ซึ่งตามรายงานของ Flegel et al. (1995) ที่ว่า SCRC ได้ทำการทดลองในกุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* สามารถทำให้กุ้งกะเปาะติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ แต่ในกุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* และ กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* อาจมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง เพราะพบปริมาณน้อยมาก ถึงแม้จะได้รับการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองก็ตาม กุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง 1 ตัวจาก 21 ตัวเพราะมีขนาดเล็กได้รับการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองปริมาณถึง 50 ไมโครลิตร (μ l) เท่ากับกุ้งก้ามกรามตัวอื่น ๆ ที่มีขนาดใหญ่ นอกจากนี้กุ้งก้ามกรามตัวที่อยู่ในระยะยังไม่โตเต็มที่ ทำให้อ่อนแอต่อการติดเชื้อ และกำจัดเชื้อในอัตราที่น้อยกว่ากุ้งตัวอื่น

กุ้งในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* และกุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* พบว่าสามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้โดยการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันในกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* ส่วน

กุ้งหัวมันหรือกุ้งเหลือง *Metapenaeus brevicornis* ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และสามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ในกุ้งทั้ง 2 ชนิด โดยพบในเนื้อเยื่อกุ้งบริเวณต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ ปมประสาท กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน รังไข่ อวัยวะ antennal gland เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งในวงศ์ Penaeidae มีความอ่อนแอต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและมีความสามารถในการเป็นพาหะเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ เพราะกุ้ง 2 ชนิดนี้อยู่ในวงศ์เดียวกันกับกุ้งกุลาดำ จึงทำให้การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lu et al. (1994) ที่ศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง 2 ชนิด คือ *Penaeus stylirostris* และ *Penaeus vannamei* พบว่ากุ้ง 2 ชนิดนี้ สามารถติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเวลาใกล้เคียงเช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำ และ Flegel et al. (1995) รายงานว่า NICA ได้ทดลองการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguensis* และกุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* พบการติดเชื้อได้

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งชนิดต่าง ๆ โดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน การให้ได้รับเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้ผลดีกว่าการให้ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธีการให้กิน เพราะกุ้งชนิดต่าง ๆ ที่ให้ได้รับเชื้อโดยตรงแน่นอน จะตรวจพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในอวัยวะต่าง ๆ ในกุ้งทั้ง 2 วงศ์ คือ วงศ์ Palaemonidae และวงศ์ Penaeidae ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Supamattaya et al. (1996) เกี่ยวกับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปยังครัสเตเชีย 3 ชนิด ได้แก่ ปูม้า *Portunus pelagicus* ปูทะเล *Scylla serrata* และกุ้งเคย *Acetes* sp. โดยการได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ด้วยวิธีการให้กิน ฉีด และจุ่ม ปรากฏว่าวิธีการฉีดให้ผลดีกว่า

การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในอวัยวะต่าง ๆ บริเวณส่วนหัวของกุ้ง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 สามารถสรุปได้ดังตาราง 4 และภาพประกอบ 59

การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในอวัยวะต่าง ๆ บริเวณส่วนหัวของกุ้งได้แก่ บริเวณ หัวใจพบที่เซลล์หัวใจ ปมประสาทพบที่เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท อวัยวะน้ำเหลืองพบที่เซลล์อวัยวะน้ำเหลือง กล้ามเนื้อพบที่เซลล์กล้ามเนื้อ เหงือกพบที่ gill epithelium

และ hemocyte ตับและตับอ่อนพบที่ interstitial cell รังไข่พบที่ epithelial cell และ interstitial cell อันตะพบที่ epithelial cell และ interstitial cell เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือกพบที่เซลล์บุผิวใต้เปลือก และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดพบที่ interstitial cell สามารถสรุปดังตาราง 5

สรุปได้ว่าการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสามชนิด คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 สามารถตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งชนิดต่าง ๆ โดยวิธี immunocytochemistry ในแต่ละอวัยวะบริเวณส่วนหัวของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae และ Penaeidae ได้ และกุ้ง 2 วงศ์นี้มีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B) แสดงการติดสีปริมาณน้อยแตกต่างชัดเจนจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D) และ 22 kDa (Y19) ซึ่งอาจสัมพันธ์กับความสามารถในการทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกลุ่มนี้บางชนิด

ประโยชน์ของการวิจัย

เป็นแนวทางในการลดการระบาดของเชื้อไวรัสหัวเหลืองในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำเนื่องจากกุ้งที่ศึกษาในการวิจัยนี้บางชนิดมีความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสูงกว่ากุ้งกุลาดำ เช่น กุ้งก้ามกราม ถึงแม้จะให้เชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีด แต่อัตราการติดเชื้อต่ำมาก (1/21) และกุ้งส่วนใหญ่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง จึงอาจสามารถนำมาเลี้ยงร่วมกันในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อาจช่วยลดปริมาณของเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มระยะเวลาทำการทดลองการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองมากกว่า 3 วันในกุ้งชนิดต่าง ๆ
2. ทำการทดลองหรือฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเพื่อยืนยันการต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันในกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอย ตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดย RT-PCR เพื่อให้แน่ใจว่าได้มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งหลังจากให้เชื้อเป็นเวลานาน ติดตามการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในวงจรชีวิตของกุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอย

ตาราง 4 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ในกุ้งชนิดต่าง ๆ

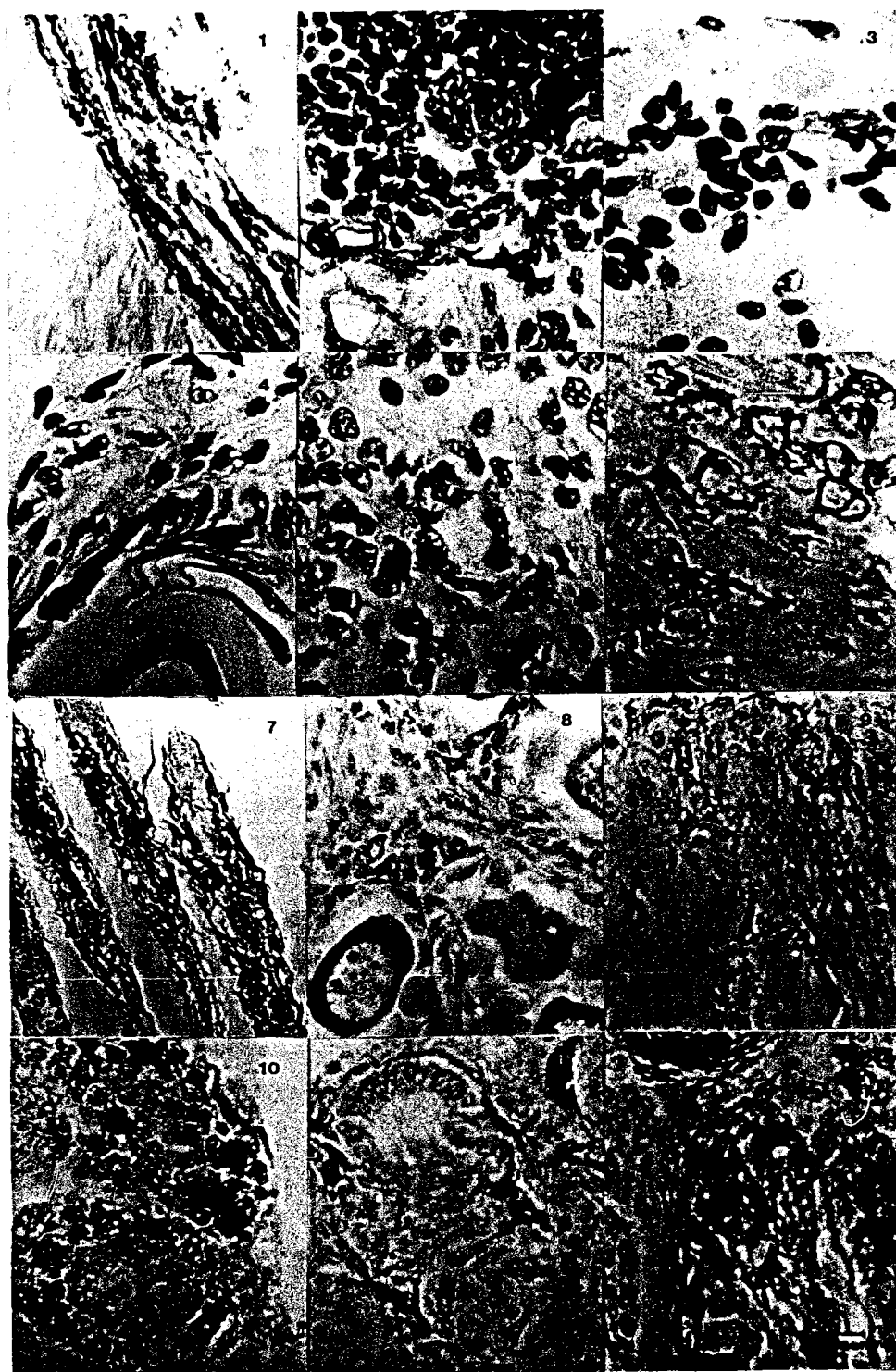
ชนิดของกุ้ง	โมโนโคลนอลแอนติบอดี			สัดส่วนการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง		
	V3-2B	Y18-2D	Y19	ธรรมชาติ	กิน	ฉีด
วงศ์ Palaemonidae						
<i>Palaemon styliferus</i>	+	+	+	0/10	0/10	9/10 (90.00%)
<i>Palaemon serrifer</i>	-	-	-	0/10	0/10	*
<i>Macrobrachium sintangense</i>	+	+	+	0/10	0/10	8/12 (66.66%)
<i>Macrobrachium lanchesteri</i> (น้ำกร่อย)	+	+	+	0/10	0/10	1/12 (8.33%)
<i>Macrobrachium lanchesteri</i> (น้ำจืด)	+	+	+	0/10	0/10	3/10 (30.00%)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (น้ำกร่อย)	+	+	+	0/10	0/10	1/11 (9.09%)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (น้ำจืด)	+	+	+	0/10	0/10	0/10
วงศ์ Penaeidae						
<i>Metapenaeus affinis</i>	+	+	+	0/10	4/10 (40%)	11/11 (100.0%)
<i>Metapenaeus brevicornis</i>	+	+	+	0/10	0/10	10/10 (100.0%)
วงศ์ Atyidae						
<i>Caridina sp.</i>	-	-	-	0/30	0/27	*

- + พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
- ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
- * ไม่ได้ทำการทดลอง

ตาราง 5 การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อตัวอ่อนชั้นต่าง ๆ ของกุ้งวงศ์ Palaemonidae
Penaeidae และ Atyidae

เนื้อเยื่อ					
Ectoderm		Mesoderm		Endoderm	
Neuronal ganglion epithelium	+	Heart	+	Hepatopancreatic cell	-
Gill epithelium	+	Lymphoid organ	+	Stomach cell	-
Ovary epithelium	+	Muscle	+		
Testis epithelium	+	Hemocyte	+		
Antennal gland epithelium	+	Interstitial cell of hepatopancreas	+		
Subcuticular epithelium	+	Interstitial cell of ovary	+		
		Interstitial cell of testis	+		
		Interstitial cell of antennal gland	+		

- + พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
- ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง



ภาพประกอบ 59 Immunocytochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ ของกุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 กำลังขยาย 200 เท่า (1 = กล้ามเนื้อ 2 = เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดของกุ้ง *Palaemon styliferus*)

3 = หัวใจของกุ้ง *Macrobrachium sintangense* 4 = เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือกของกุ้ง
Macrobrachium lanchesteri 5 = Antennal gland ของกุ้ง *Macrobrachium rosenbergii* 6
 = หัวใจ 7 = เหงือก 8 = รังไข่ของกุ้ง *Metapenaeus affinis* 9 = ปมประสาท 10 = อวัยวะ
 น้ำเหลือง 11 = ตับและตับอ่อน 12 = อัณฑะของกุ้ง *Metapenaeus brevicornis*

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กัลยานี ยงจินดารัตน์. (2531). การกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2543). กุ้งไทย 2000. กรุงเทพฯ : เจริญรัฐการพิมพ์.
- ทรงศักดิ์ ศรีบุญจิตต์. (2544). "สถานภาพการผลิตการตลาดของกุ้งไทยในเวทีโลกและผลกระทบเชิงสังคมเศรษฐกิจศาสตร์ของการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ," อินไซด์กุ้งไทย. 1(2): 4 - 5.
- นงนุช ลีลาปิยะนาถ. (2532). อนุกรมวิธานของกุ้งฟีนีออยในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. (2532). อนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนีคในประเทศไทย. วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. (2535). *Baculovirus* สาเหตุโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง ระหว่างวันที่ 16 – 19 กุมภาพันธ์ 2535 ณ ห้องประชุมสถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. กรุงเทพฯ : 200 – 205.
- Anderson, I.G. and Prior, H.C. (1992). "Baculovirus infections in the mud crab, *Scylla serrata* and a freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* from Australia," *Invertebrate pathol.* 60 : 265 – 273.
- Chantanachookin, C. et al. (1993). "Histology and ultrastructure reveal a granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow head diseases," *Diseases of Aquatic Organisms.* 17 : 145 – 157.
- Chen, L.L. et al. (2000). "Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) in benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*," *Diseases of Aquatic Organisms.* 40 : 157 – 161.

- Chou, H.Y. et al. (1995). "Pathogenecity of a baculovirus infection causing white spot Syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan," *Diseases of Aquatic Organisms*. 25 : 133 – 141.
- Flegel, T.W. and Fegan, D.F. (1993). "Shrimp health management : An environmental approach," In presented at the Malaysian Fisheries Society Seminar "Diseases in aquaculture the current issues," Merlin Subang Hotel, Selangor, Malaysia ; 6 February 1993. P.1 – 17.
- Flegel, T.W. Boonyaratpalin, S. and Withyachumnarnkul, B. (1997). "Progress in research on yellow head virus and white spot virus in Thailand," In Flegel, T.W. and I.H. MacRae (eds), *Diseases in Aquaculture III*, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p.285 – 302.
- Flegel, T.W. et al. (1996). "Progress in characterization and control of yellow head virus of *Penaeus monodon*," In Browdy, C. and S. Hopkins, (eds), *Swimming through troubled water ; Proceeding of the special session on shrimp farming, Aquaculture' 95, San Diego, February, 1995* World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p.76 – 83.
- _____. (1997). "Special topic review : major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 13 : 433 – 442.
- Holthuis, L.B. (1980). *FAO Species Catalogue Vol.1 – Shrimps and Prawns of the World*. FAO Fisheries Synopsis. 125 (1) : 20 – 115.
- Kanchanaphum, P. et al. (1998). "Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 1 – 7.

- Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S. and Supamattaya, K. (1995). "Electron microscopic observation on the replication of yellow head baculovirus in lymphoid organ of *Penaeus monodon*," In *Diseases in Asian Aquaculture II*. M. Shariff, J.R. Arthur @ R.P. Subasinghe (eds.) p.99 – 105. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Kasornchandra, J. et al. (2000). "Vertical transmission of white spot syndrome virus," In : *The 2nd National Symposium on Marine Shrimp*. Phuket, Thailand. p.32 – 41.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. (1998). "Shrimp disease and current diagnostic methods," *Aquaculture*. 164 : 201 – 220.
- Lo, C. F. et al. (1996). "White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods," *Diseases of Aquatic Organisms*. 27 : 215 – 225.
- Lu, Y. et al. (1994). "Infection of the yellow head baculo – like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone)," *Fish Diseases*. 17 : 649 – 659.
- _____. (1995). "Distribution of yellow – head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 23 : 67 – 70.
- Lu, Y., Tapay, L.M. and Loh, P.C. (1996). "Development of a nitrocellulose – enzyme immunoassay for the detection of yellow head virus from penaeid shrimp," *Fish Diseases*. 19 : 9 – 13.
- Nadala, E.C. B.Jr., Tapay, L.M. and Loh, P.C. (1997). "Yellow head – virus : a rhabdovirus – like pathogen of penaeid shrimp," *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 141 – 146.

- Nadala, E.C. B. Jr., et al. (1997). "Detection of yellow head virus and chinese baculovirus in penaeid shrimp by the western blot technique," *Journal of Virological Methods*. 69 : 39 – 44.
- Nadala, E.C. B.Jr. and Loh, P.C. (2000). "Dot – blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white – spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp," *Journal of Virological Methods*. 84 : 175 – 179.
- Nunan, L.M., Poulos, B.T. and Lightner, D.V. (1998). "The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in import commodity," *Aquaculture*. 160 : 19 – 30.
- Sithigorngul, P. et al. (2000). "Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 42 : 27 – 34.
- Supamattaya, K. et al. (1998). "Experimental transmission of White spot Syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 1 – 7.
- Tapay, L.M. et al. (1997). "Infection of White spot baculovirus – like virus (WSBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris*. (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone)," *Diseases in Aquaculture III*. Asian Fisheries Society, Manila. 297 – 302 p.
- Wongteerasupaya, C. et al. (1995). "Yellow – head virus of *Penaeus monodon* is RNA virus," *Diseases of Aquatic Organisms*. 22 : 45 – 50.
- _____. (1997). "Detection of yellow head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification," *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 181 - 186.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (Coated slide solution)

Gelatin	1.00 กรัม
Clone alum (chromium potassium sulphate)	0.05 กรัม
H ₂ O (distilled water) ปรับปริมาตรเป็น	100.00 มิลลิลิตร

2. Davidson's fixative

95% Ethyl alcohol	33.00 มิลลิลิตร
100% Formalin	22.00 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	11.5 มิลลิลิตร
H ₂ O (distilled water) ปรับปริมาตรเป็น	33.5 มิลลิลิตร

3. Phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M 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
หรือ Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2.15 กรัม
H ₂ O (distilled water) ปรับปริมาตรเป็น	1,000.00 มิลลิลิตร

4. สารละลาย Calf serum 10% (P_1^+)

Calf serum	10.00 มิลลิลิตร
PBS ปรับปริมาตรเป็น	100.00 มิลลิลิตร

5. สี Ehrlich's acid hematoxylin

Hematoxylin	8.00 กรัม
Ethyl alcohol 95%	400.00 มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8.00 กรัม
H ₂ O (distilled water)	400.00 มิลลิลิตร
Glycerine	400.00 มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	40.00 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมี (ต่อ)

6. 0.2% Eosin Y ใน Ethyl alcohol 95%

สี eosin

0.2 กรัม

Ethyl alcohol 95%

100.00 มิลลิลิตร

7. เชื้อไวรัสหัดเหลือง เจือจาง 1 : 500 ด้วย 2X PBS

เชื้อไวรัสหัดเหลืองที่ผ่านการกรองด้วย

กระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรู 0.45 μm

1.0 ไมโครลิตร

2X PBS

499.0 ไมโครลิตร

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวยัยนั๊บ แวและ
วันเดือนปีเกิด	15 พฤษภาคม 2512
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนราธิวาส
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 108 หมู่ 5 ตำบลโคกเคียน อำเภอเมือง จังหวัดนราธิวาส 96000
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	อาจารย์ 1 ระดับ 5
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนเวียงสุวรรณวิทยาคม อำเภอแว้ง จังหวัดนราธิวาส
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2531	มัธยมศึกษาปีที่ 6 (แผนกวิทย์ – คณิต) จากโรงเรียนอัสตดร์กียะหืออิสลามียะห์
พ.ศ. 2535	วท.บ. (ศึกษาศาสตร์) จากมหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
พ.ศ. 2544	กศ.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพฯ