

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของสัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอด มัลลัสค์ และแอนเนลิด
ที่พบในบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ปริญญานิพนธ์
ของ
วิลาวัลย์ รักษาธรรม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ตุลาคม 2548
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

639.58
๑๖๑๙๓
ร.3

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหิวเหลืองของสัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอด มัลลัสค์ และแอนเนลิด
ที่พบในบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

บวคัดย่อ
ของ
วิลาวัลย์ รักษาธรรม



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ตุลาคม 2548

h 282914

[-2 กพ. 2549

วิลาวัลย์ รักษาธรรม. (2548). การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของสัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอด
มัลลัสค์ และแอนเนลิด ที่พบในบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ปรินซ์นิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา).
กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม:
รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล, รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล.

จากการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV) ในสัตว์กลุ่มอาร์โทรพอด (arthropods)
ชนิดต่างๆ ได้แก่ กุ้งวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ 1 ชนิด แมลงปอวงศ์ Agrionidae ได้แก่ ตัวอ่อน
แมลงปอเข้ 1 ชนิด สัตว์วงศ์ Gammaridae ได้แก่ แอมฟิพอด 1 ชนิด แมงดาทะเลวงศ์ Limulidae
ได้แก่ แมงดาหางกลม 1 ชนิด สัตว์ในกลุ่มมัลลัสค์ (mollusks) ได้แก่ หอยวงศ์ Muricidae ได้แก่ หอย
มะระ 1 ชนิด และหอยวงศ์ Thiaridae อีก 2 ชนิด ได้แก่ หอยเจดีย์ 1 และหอยเจดีย์ 2 ซึ่งรวบรวมจาก
แหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอเมือง อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ และอำเภอรังสิต
คลอง 8 จังหวัดปทุมธานี ส่วนสัตว์ซึ่งเป็นอาหารสด ประกอบด้วยสัตว์ในกลุ่มแอนเนลิด (annelids)
วงศ์ Lumbriculidae ได้แก่ ไส้เดือนแดง 1 ชนิด กลุ่มอาร์โทรพอด (arthropods) วงศ์ Chironomidae
ได้แก่ หนอนแดง 1 ชนิด วงศ์ Artemiidae ได้แก่ ไรน้ำเค็ม 1 ชนิด วงศ์ Daphnidae ได้แก่ ไรแดง 1
ชนิด จากตลาดสวนจตุจักร จังหวัดกรุงเทพฯ นำมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ
และการชักนำการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง 2 วิธี คือ การให้สัตว์ทดลองที่มีขนาดเล็กกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติด
เชื้อไวรัสหัวเหลืองและการฉีดด้วยฮีโมลิมพ์ (haemolymph) ของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้กับ
สัตว์ทดลองที่มีขนาดใหญ่ 2 วงศ์ ได้แก่ คือ แมงดาหางกลม และ หอยมะระ จากนั้นนำสัตว์ทดลอง
เหล่านี้มาตรวจการติดเชื้อไวรัสในวันที่ 3 5 10 และ 30 รวมทั้งสัตว์ที่รวบรวมจากธรรมชาติ (0 วัน)
พบว่าไม่มีอาการของการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และจากผลการตรวจสอบโดยวิธีทางเนื้อเยื่อ (immuno -
histochemistry) ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองดังกล่าว แต่ในกรณีของหอย
ทั้ง 3 ชนิดพบการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อ ที่สามารถจับกับแอนติบอดีได้อย่างไม่
จำเพาะ นอกจากนี้ยังได้ยืนยันผลการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR ซึ่งให้ผลลบเช่นเดียวกัน จากการ
ทดลองในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า ไม่มีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในสัตว์ชนิดต่างๆ เหล่านี้ ซึ่งสัตว์เหล่านี้อาจมี
ความทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

DETECTION OF YELLOW HEAD VIRUS INFECTION IN ARTHROPODS, MOLLUSKS
AND ANNELIDS FOUND NEARBY *PENAEUS MONODON* FARMING AREAS

AN ABSTRACT
BY
WILAWAN RAKSATHAM

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Biology
at Srinakharinwirot University
October 2005

Wilawan Raksatham. (2005). *Detection of yellow head virus in arthropods mollusks and annelids found nearby Penaeus monodon farming areas*. Master thesis, M. Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor. Committee : Assoc. Prof. Dr. Weerawan Sithigorngul, Assoc. Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul.

Various kinds of animals including Arthropods, small shrimp *Caridina* sp. (Atyidae), horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda* (Limulidae), damselfly nymph *Ischnura* sp. (Agrionidae), amphipod *Gammarus* sp. (Gammaridae); mollusks *Thais* sp. (Muricidae), *Melanoides tuberculata* and *Sermyla riqueti* (Thiaridae) found nearby *Penaeus monodon* farming areas in Smutprakan and Pratumthani provinces were surveyed for yellow head virus (YHV) infection. Besides these animals, the common life feed animal such as brineshrimp *Artemia salina* (Artemiidae) water flea *Moina macrocopa* (Daphnidae), midge *Chironomus* sp. (Chironomidae), sun worm *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Annelida) were included in this investigation. All tested animals were either injected with YHV-infected haemolymph (in case of large animals) or fed with muscle from *P. monodon* infected with YHV. The YHV infection was monitored at days 3 10 and 30 post infection by immunohistochemistry using monoclonal antibodies (MAbs) specific to gp116, gp64 and p20 of YHV along with MAbs specific to white spot syndrome virus (WSSV) and hepatopancreatic virus (HPV). None of the viruses determined was observed in these animals in both natural and experimental infection. The results were confirmed by one step RT-PCR for YHV. Therefore, these animals are quite tolerance for YHV infection. However, the investigation for toleration to other viruses is needed in order to confirm the need for management for prevention of the potential carriers in the farming system. The result of this experiment revealed that all animals investigated in this study can tolerate to YHV infection.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของสัตว์ในกลุ่มอาร์โทรพอด มอลลัสค์ และแอนเนลิด
ที่พบในบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

ของ

นางสาววิลาวัลย์ รักษาธรรม

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

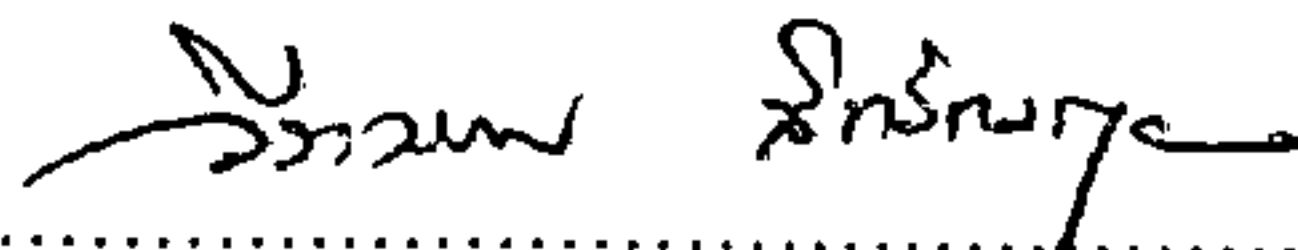


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)

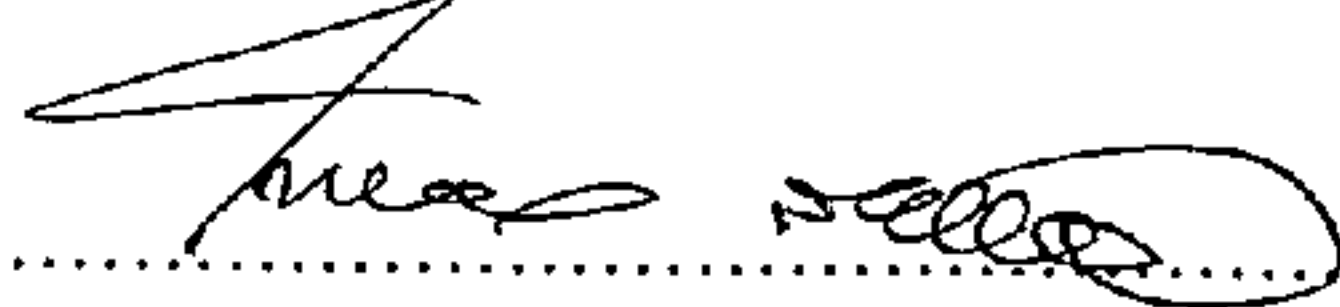
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2548

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์



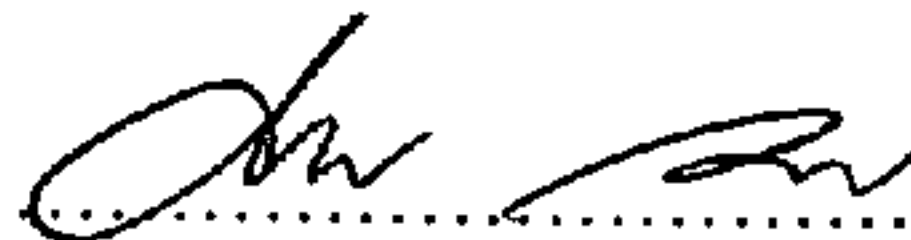
.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)



.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล)



.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยงค์)



.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(อาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิราษฎร์)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ให้คำปรึกษาและแนะนำอย่างดียิ่งจาก
รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ ดร.
ศิวาพร ลงยันต์ และอาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญญา จากภาควิชาชีววิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาตรวจสอบลักษณะอนุกรมวิธานของหอยวงศ์ Muricidae
และวงศ์ Thiaridae

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์ จากภาควิชาชีววิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาตรวจสอบลักษณะอนุกรมวิธานของไส้เดือนแดง
วงศ์ Lumbriculidae

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับการให้ทุนสนับสนุน
งานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับการให้ทุนการศึกษาส่วน
หนึ่งเพื่อเป็นการสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวรรณิภา เพ็ชรนภักดิ์ คุณสมบัติ รักประทานพร คุณพอจิต วิโนทพรรษ์ และคุณ
นันทิกา ปานจันทร์ ที่ช่วยสอนด้านเทคนิคต่าง ๆ ของงานวิจัยและให้คำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณสุณีรัตน์ ศรีทราหมั่น คุณภิรมย์ศักดิ์ พัฒนไพจิตรกุล คุณจรัสพร ตั้งขบวนบุตร
และคุณธนวรรณ เตชางกูร ที่ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ ผู้บังคับบัญชาชั้นต้น นายกฤษฎาคม ดีพลงาม ผู้อำนวยการโรงเรียนบ่อพันขัน
วิทยา ที่ให้คำแนะนำในเรื่องการลาศึกษาต่อและการนำเสนอผลงานทางด้านวิชาการ ตลอดจนนำความรู้
ประสบการณ์ในหลักสูตรไปใช้กับหลักปฏิบัติการเรียนการสอนในสถานศึกษา ขอขอบคุณพี่ๆและน้องใน
โรงเรียนบ่อพันขันวิทยาทุกท่าน ที่คอยให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจมาตลอดจนวันนี้เกิดขึ้นได้

สุดท้ายนี้ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณดา (ผู้ล่วงลับ) คุณยาย บิดามารดา พี่สาวทั้งสองและ
น้องชาย ที่สนับสนุนในด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด จนทำให้ปริญญานิพนธ์
ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี และขอขอบคุณผู้ที่ได้ให้ช่วยเหลือทุกท่านที่มีได้กล่าวนามไว้ในที่นี้ด้วย

วิลาวัลย์ รักษาธรรม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

และ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
ไวรัสหัวเหลือง.....	8
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ต่างๆในไฟลัม Arthropoda, Mollusca และ Annelida.....	8
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Atyidae	8
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Artemiidae	8
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Daphnidae	9
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Gammaridae	9
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Chironomidae	9
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Limulidae	10
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Lumbriculidae.....	10
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Agriomidae	10
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Muricidae	11
ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Thiaridae	11
การศึกษาและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไวรัสหัวเหลือง.....	12
การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับพาหะของโรคไวรัสหัวเหลือง.....	16
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
สัตว์ทดลอง.....	20
อุปกรณ์และสารเคมี.....	20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3(ต่อ) วิธีดำเนินการทดลอง.....	23
การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงสัตว์.....	24
การพิสูจน์ทราบชนิด.....	24
การเตรียมเชื้อไวรัสหัดเหลือง.....	24
วิธีทดลอง.....	24
การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ.....	25
การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	33
การพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์.....	33
การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองโดยวิธี RT- PCR.....	42
การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry.....	48
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	58
บรรณานุกรม.....	61
ภาคผนวก.....	66
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	84

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงอุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบในแต่ละขั้นตอนของการทำงานของ ปฏิกิริยา RT-PCR.....	27
2 แสดงชนิดสัตว์ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ที่ชักนำให้ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง โดยการให้กินเนื้อกึ่งกุกูลาค่าที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง แล้วเก็บตัวอย่าง มาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ	44
3 แสดงชนิดสัตว์ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ชักนำให้ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง โดยการฉีด แล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ.....	45
4 แสดงผลการติดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์ 1 (<i>Melanoides tuberculata</i>) และหอยเจดีย์2 (<i>Sermyla riqueti</i>) เมื่อหยด 1 % H ₂ O ₂	50
5 แสดงผลการติดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อของหอยมะระ (<i>Thais</i> sp.) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง	52
6 แสดงผลการติดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์1 (<i>Melanoides tuberculata</i>) และหอยมะระ (<i>Thais</i> sp.) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง	55

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงตำแหน่งการแสดงผลของ gel electrophoresis (RT-PCR).....	28
2 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่งในการตรวจหาเชื้อไวรัส.....	30
3 แสดงลักษณะของกุ้งกะปิ (<i>Caridina</i> sp.).....	35
4 แสดงลักษณะของไรน้ำเค็ม (<i>Artemia salina</i>).....	35
5 แสดงลักษณะของไรแดง (<i>Moina macrocopa</i>).....	36
6 แสดงลักษณะของแอมฟิพอด (<i>Gammarus</i> sp.).....	36
7 แสดงลักษณะของตัวอ่อนแมลงปอเข็ม (<i>Ischnura</i> sp.).....	37
8 แสดงลักษณะของตัวเต็มวัยแมลงปอเข็ม (<i>Ischnura</i> sp.).....	37
9 แสดงลักษณะของไส้เดือนแดง (<i>Lumbriculus variegatus</i>).....	38
10 แสดงลักษณะของหนอนแดง (<i>Chironomus</i> sp.).....	38
11 แสดงลักษณะของแมงดาหางกลม(<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>)	39
12 แสดงลักษณะของหอยมะระ (<i>Thais</i> sp.)	40
13 แสดงลักษณะของหอยเจดีย์ 1 (<i>Melanoides tuberculata</i>).....	41
14 แสดงลักษณะของหอยเจดีย์ 2 (<i>Sermyla riqueti</i>).....	42
15 แสดงผลจาก RT-PCR ของกุ้งกะปิ (<i>Caridina</i> sp.) ที่รวบรวมจากธรรมชาติ (0 วัน) และการให้กินเนื้อกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลือง ที่ระยะเวลา 5 และ10 วัน ตามลำดับ.....	4
16 แสดงผลจาก RT-PCR ของหอยมะระ (<i>Thais</i> sp.) ที่รวบรวมจากธรรมชาติ (0 วัน) และการฉีดไวรัสหัวเหลือง ที่ระยะเวลา 3 และ10 วัน ตามลำดับ	47
17 แสดงการหยด 1 % H ₂ O ₂ , GAM-HRP และโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง	50
18 Immunohistochemistry แสดงเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์ 2 (<i>Sermyla riqueti</i>) ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่เชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 5 วัน	51

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
19 แสดงการหยด 1% H ₂ O ₂ , GAM-HRP และโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง.....	52
20 Immunohistochemistry แสดงเนื้อเยื่อของหอยมะระ (<i>Thais</i> sp.).....	53
21 Immunohistochemistry แสดงเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์ 2 (<i>Sermyla riqueti</i>).....	54
22 แสดงการหยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส และแบคทีเรีย (<i>Vibrio harveyi</i>)	55
23 Immunohistochemistry แสดงเนื้อเยื่อของสัตว์ชนิดต่าง ๆ ที่นำมาทดลอง ให้ติดเชื้อโดยการฉีดและให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่เชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Y19).....	56
24 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อส่วนหัว ของกุ้งกุลาดำที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี (Y19).....	57

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้เริ่มเข้าสู่ระบบการเพาะเลี้ยงแบบพัฒนาในปี พ.ศ. 2529 เป็นต้นมา ทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ขยายตัวออกไปอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว ตามพื้นที่จังหวัดต่างๆที่ติดต่อกับชายทะเล ซึ่งในปัจจุบันมีเนื้อที่การเลี้ยงกุ้งประมาณ 450,000 ไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 200,000-250,000 ตันต่อปี ส่งผลให้ในปี พ.ศ.2534 ประเทศไทยกลายเป็นผู้นำในการส่งออกกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์ไปยังตลาดโลก และยังคงความเป็นผู้นำมาจนถึงปัจจุบันนี้ โดยสามารถสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศปีละกว่า 100,000 ล้านบาท (สิริ ทุกข์วินาศ และชุตินา ขมวิลัย. 2545 : ออนไลน์) แม้ว่าอุตสาหกรรมนี้จะมีการพัฒนาและเติบโตได้อย่างรวดเร็วเพียงใดก็ตาม แต่ก็ยังประสบปัญหาและอุปสรรคต่างๆ เช่น ปัญหามลพิษและความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อม การจัดการฟาร์ม ปัญหาทางการค้าและการตลาด และปัญหาโรคติดเชื้อระบาดในกุ้งกุลาดำ (Flegel, et al. 1995 : 79-82. ; สิทธิ บุญยรัตผลิน. 2536 : 1) ปัญหาโรคระบาดจัดเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญที่สุด และก่อให้เกิดความสูญเสียต่อผลผลิตกุ้ง สาเหตุเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรียและโปรโตซัว ซึ่งได้สร้างความเสียหายอย่างรุนแรงและต่อเนื่องต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งอยู่จนปัจจุบัน (สิริ ทุกข์วินาศ และ ชุตินา ขมวิลัย. 2545 : ออนไลน์) โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เพราะเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสแล้ว การรักษาจะกระทำได้ยากมาก เพราะเชื้อไวรัสจะเข้าไปเพิ่มจำนวนอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเท่านั้น ถ้าเชื้อไวรัสมีความรุนแรงมากกุ้งก็จะตายอย่างรวดเร็ว การใช้อาหารหรือสารเคมีใดๆ มักไม่ได้ผล (สิทธิ บุญยรัตผลิน. 2536 : 2)

ไวรัสที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus ; WSSV) ไวรัสเฮปาทopancreatic parvo-like virus ; HPV) ไวรัสเอ็มบีวี (monodon baculovirus ; MBV) และไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus ; YHV) ไวรัสเหล่านี้เมื่อเข้าสู่กุ้งแล้วจะอาศัยและทำอันตรายต่ออวัยวะของกุ้ง ก่อให้เกิดอาการและความรุนแรงแตกต่างกันไป (Supamattaya, et al. 1998 : 80) ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศต่างๆทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย โดยเฉพาะไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งพบการระบาดอย่างรุนแรงทั่วไปในรอบสิบปีที่ผ่านมา (Flegel, et al. 1997 : 285)

เมื่อปี พ.ศ. 2533 ประเทศไทยพบการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองเป็นครั้งแรก ในภาคตะวันออกและภาคกลาง และต้นปี พ.ศ. 2535 สร้างความเสียหายอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาอันสั้น ทำความเสียหายไม่ต่ำกว่า 500 ล้านบาท มาจนถึงปัจจุบันก็ยังมีการระบาดอยู่ในพื้นที่หลายจังหวัด (สิทธิ บุญยรัตผลิน. 2536 : 1) ลักษณะอาการที่แสดงให้เห็นเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองคือ วันแรกกุ้งจะลอยขึ้นมาเกยตามบริเวณขอบบ่อ กินอาหารจะลดลงจนผิดสังเกต อ่อนเพลียไม่มี

แรงติดตัว ส่วนหัว (cephalothorax) จะมีสีซีดเหลือง ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) จะบวมและมีสีเหลือง เหงือกเหลืองเห็นชัดเจนในวันที่สองหลังจากที่เริ่มเห็นอาการ วันที่สามกุ้งจะตายเพิ่มขึ้นประมาณ 50 % ถึง 70 % ในวันที่สี่และห้ากุ้งจะตายหมดหรือเกือบหมดทั้งบ่อ (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคนอื่นๆ. 2535 : 200) เมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำทุกชนิดแล้วพบว่าโรคหัวเหลืองทำให้กุ้งตายรวดเร็วและรุนแรงมากที่สุด ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก

แม้ว่านักวิชาการได้พยายามศึกษา เพื่อหาวิธีการรักษาโรคติดเชื้อจากไวรัสชนิดนี้ แต่ในปัจจุบันพบว่ายังไม่มียาหรือสารเคมีใดๆที่จะรักษาโรคไวรัสหัวเหลืองได้ ดังนั้นแนวทางที่ดีที่สุดจึงมีเพียงวิธีการป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ได้แก่ การจัดการสิ่งแวดล้อมในบริเวณบ่อเพาะเลี้ยง การเตรียมบ่อและการแยกใช้อุปกรณ์แต่ละบ่อเพาะเลี้ยงไม่ให้ปะปนกัน หลีกเลี่ยงการให้อาหารสดในการเพาะเลี้ยง (Flegel, et al. 1995 : 81. ; สิทธิ บุญยรัตผลิน. 2536 : 1-2) การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่แข็งแรง การตรวจหาเชื้อไวรัสในลูกกุ้งวัยอ่อนโดยใช้วิธี RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) ก่อนปล่อยลูกกุ้งลงบ่อเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่มีปริมาณไวรัสน้อยได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว (Wongteera - supaya, et al. 1995 : 185) แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดคือใช้ห้องปฏิบัติการเฉพาะ อุปกรณ์และค่าใช้จ่ายมีราคาสูง รวมถึงบุคลากรต้องมีความชำนาญ การกำจัดสัตว์ชนิดต่างๆที่ปะปนอยู่ในบริเวณบ่อเลี้ยง ซึ่งคาดว่าจะน่าจะเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลือง ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merquiensis*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) กุ้งเคย (*Acetes* sp.) กุ้งกะเปาะ (*Palaemon styliferus*) (Flegel, et al. 1997 : 287) กุ้งกะต๋อม (*Macrobrachium sintangense*) กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) (ยัยนับ แวะ และ. 2545 : บทคัดย่อ) จึงมีความจำเป็นสำหรับใช้เป็นแนวทางการป้องกันและกำจัดสัตว์ที่เป็นพาหะเหล่านั้น เพื่อลดปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองมีการผลิตได้สำเร็จ โดยทำการปลูกภูมิคุ้มกันให้แก่หนูเมาส์ด้วยสารสกัดของเหงือกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว คือ V3-2B ซึ่งเป็น clone ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองอย่างสูง สามารถจับไวรัสหัวเหลืองได้ทั้ง native antigen และ SDS-treated viral specific antigen และสามารถใช่วิธี immunohistochemistry ตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ของเนื้อเยื่อเหงือกและเม็ดเลือด (haemocyte) ของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แต่ไม่พบปฏิกิริยาการจับระหว่างแอนติบอดี (antibody) กับแอนติเจน (antigen) ในเนื้อเยื่อของกุ้งปกติ ทั้งยังสามารถใช้ V3-2B และวิธี immunohistochemistry ในการตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองในกุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในขณะที่เนื้อเยื่อกุ้งกลุ่มควบคุมหรือกุ้งปกติที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ไม่ให้ผลบวก และนอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot พบว่า แอนติบอดีทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้เฉพาะในกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่านั้น (Sithigorngul, et al. 2000 : 27)

ต่อมาปี ค.ศ. 2002 Sithigorngul et al. สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของไวรัสหัวเหลือง สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้ออกเป็น 4 กลุ่ม โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มแรกสามารถจับกับ native protein ของไวรัสหัวเหลือง ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีกสามกลุ่มที่เหลือสามารถทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 22 67 และ 135 กิโลดาลตัน ทั้งในรูป native form และ denatured form โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 กลุ่มสามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้โดยวิธี dot blot และวิธี immunohistochemistry

การศึกษาถึงความเป็นพาหะของโรคไวรัสในสัตว์ชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่จะเป็นรายงานเกี่ยวกับพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาว เนื่องจากไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมเป็น DNA จึงศึกษาได้ง่ายกว่าไวรัสหัวเหลืองซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็น RNA สำหรับการศึกษาถึงความเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลือง มีรายงานว่า พบการติดเชื้อหลังจากการฉีดเชื้อให้แก่กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) และกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) และจากการฉีดสารที่สกัดได้จากกุ้งเคย (*Acetes* sp.) จากบ่อเลี้ยงกุ้งที่เกิดโรคให้แก่กุ้งกุลาดำปกติที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ สามารถชักนำให้กุ้งกุลาดำปกติเหล่านี้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ (Flegel, et al. 1997 : 285)

จากความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อไวรัสหัวเหลือง ทำให้สามารถใช้แอนติบอดีตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในสัตว์โดยร่วมกับวิธี immunohistochemistry ซึ่งวิธีนี้เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก และได้ผลแน่นอน ดังนั้นจึงสามารถใช้ศึกษาความสามารถในการติดเชื้อในสัตว์ชนิดต่างๆ ที่คาดว่าจะอาจจะเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองได้

สำหรับการศึกษานี้จะเป็นการศึกษาสัตว์ชนิดต่างๆ ที่พบได้บ่อยๆ และบริเวณใกล้เคียง ได้แก่ ตัวอ่อนของแมลงปอเข็ม แมงดาหางกลม กุ้งกะปิ แอมฟิพอด หอยบางชนิด และสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารสดสำหรับใช้เลี้ยงลูกกุ้ง ได้แก่ ไรน้ำเค็ม ไรแดง หนอนแดง และไส้เดือนแดง ซึ่งสัตว์เหล่านี้อาจจะสามารถเป็นพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลืองไปสู่กุ้งได้

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสามารถในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของสัตว์ชนิดต่างๆ ในกลุ่มอาร์โทรพอด (Arthropods) มอลลัสค์ (Mollusks) และแอนนิลิด (Annelids) โดยตรวจหาการติดเชื้อตามธรรมชาติ และจากการทดลองโดยวิธีการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และวิธีการฉีดไวรัสหัวเหลืองให้กับสัตว์ทดลองซึ่งคาดว่าจะอาจเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองจากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งจากพื้นที่ต่างๆ

ขอบเขตของการวิจัย

1. สํารวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติของสัตว์ชนิดต่างๆ ในกลุ่มอาร์โทรพอด มัลลัสค์ และแอนนิลิด รวมทั้งสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารสดสำหรับใช้เลี้ยงลูกกุ้ง
2. ทดลองการติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสและการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ให้แก่สัตว์ชนิดต่างๆ ที่นำมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ
3. ทดลองการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารสดบางชนิดที่ใช้เลี้ยงลูกกุ้ง โดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสหัวเหลือง
4. ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของสัตว์ชนิดต่างๆ โดยวิธี RT-PCR และ indirect peroxidase immunohistochemistry

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ต่างๆที่พบในแหล่งเลี้ยงกุ้ง ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้
2. เพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารสดสำหรับใช้เลี้ยงลูกกุ้ง ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้
3. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดการและวางแนวทางการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสหัวเหลืองต่อไป

นิยามศัพท์เฉพาะ

ศัพท์ที่ 1 ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus ; YHV)

ไวรัสหัวเหลือง มีโครงสร้างลักษณะรูปร่างเป็นแบบแท่ง (bacilliform) ขนาดประมาณ 50-60×150-200 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสเป็น nucleocapsid มีเปลือกหุ้ม (envelope) ล้อมรอบ ซึ่งมีลักษณะเป็นปุ่มปมหรือหนาม (spikes) มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยว (ssRNA : single stranded RNA) (Wongteerasupaya, et al. 1995 : 45. ; Cowley, et al. 2000 : 159-160) ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 22 67 135 และ 170 กิโลดาลตัน (Nadala, Tapay & Loh. 1997 : 142-143) ปัจจุบันจัดอยู่ในสกุล Okavirus วงศ์ Roniviridae (Mayo. 2003 : 1655-1656) อันดับ Nidovirales (Sittidilokratana, et al. 2002 : 87-88.)

ศัพท์ที่ 2 ไวรัสเฮปไฟ (hepatopancreatic parvo-like virus ; HPV)

ไวรัสเฮปไฟ เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อไวรัสขนาดประมาณ 22-24 นาโนเมตร รูปร่างเป็นแบบ icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม (unenveloped viral particles) มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายเดี่ยว (ssDNA : single-stranded DNA) จัดอยู่ในวงศ์ Parvoviridae (Bonami, et al. 1995 : 816. ; Spann, et al. 1997 : 240. ; Sukhumsirichantal, et al. 1999 : 1) และจากการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของไวรัสเฮปไฟ พบโปรตีนเพียงชนิดเดียวเป็น polypeptide มีน้ำหนักโมเลกุล 54 กิโลดาลตัน (Bonami, et al. 1995 : 816)

ศัพท์ที่ 3 ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus ; WSSV)

ไวรัสตัวแดงดวงขาว เป็นไวรัสที่มีขนาดใหญ่รูปไข่ (ovoidral) ขนาดประมาณ 275 ×120 นาโนเมตร มีส่วนที่ยื่น (appendage) ออกมาจากปลายด้านหนึ่งลักษณะคล้ายหาง 1 เส้น อนุภาคของไวรัสประกอบด้วย nucleocapsid มีเปลือกหุ้ม 3 ชั้น (trilamina envelope) มีจีโนมเป็น DNA สายคู่ต่อกันเป็นวงกลม (dsDNA : double stranded DNA) โครงสร้างโปรตีนของไวรัส ประกอบด้วย polypeptide 5 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันๆ ตั้งแต่ 15-28 กิโลดาลตัน จัดอยู่ในสกุล Whispovirus วงศ์ Nimaviridae (Marks, et al. 2003 : 1517)

ศัพท์ที่ 4 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody)

แอนติบอดีที่สร้างจากกลุ่มเซลล์พลาสมา (plasma cell) ซึ่งกำเนิดมาจาก B lymphocyte เซลล์เดียว ทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการ ทั้งในด้านความจำเพาะต่อ epitope ของแอนติเจน และในด้านชนิดของ heavy chain และ light chain ของอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของแอนติบอดีชนิดนั้น (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ และคนอื่นๆ. 2537 : 365)

ในภาวะปกติร่างกายจะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีหลายๆชนิดรวมกันซึ่งรวมเรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) แต่จะสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพียงชนิดเดียวเมื่อเป็นโรคมะเร็งของ B lymphocyte หรือเซลล์พลาสมา เช่น โรค multiple myeloma โดยที่เซลล์พลาสมาปกติเซลล์หนึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง (myeloma cell) เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เหล่านี้อย่างไม่หยุดยั้ง และสร้างจำนวนแอนติบอดีชนิดเดียวกันจำนวนมากออกมาให้สามารถตรวจสอบได้ สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการและนำไปใช้ในการรักษาโรคในปัจจุบันเป็นชนิดที่ผลิตขึ้นในห้องทดลองโดยวิธีต่างๆกัน ที่สำคัญมี 2 วิธี ได้แก่ วิธี somatic hybridization ซึ่งเป็นการเชื่อมต่อเซลล์สองเซลล์เข้าด้วยกัน โดยเซลล์หนึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดีได้ อีกเซลล์หนึ่งสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างไม่

หยุดยั้ง วิธีการนี้ทำให้ได้กลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า hybridoma ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถสร้างแอนติบอดี และมีชีวิตยืนยาว (immortalize) และสามารถเพิ่มจำนวนได้โดยไม่มีสิ้นสุด ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือการใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมเพื่อแยกเอา immunoglobulin gene ออกมาดัดแปลงและนำกลับใส่เข้าไปในเซลล์ใหม่ วิธีที่สองมีข้อดีเหนือกว่าวิธีแรกในหลายๆด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถดัดแปลงในระดับยีนทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามที่ต้องการ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตโดยวิธีที่สองนี้เรียกว่า genetically engineered antibody (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ และคนอื่นๆ. 2537 : 365)

ปัจจุบันมีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการวินิจฉัยและการรักษา การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีข้อดีเหนือกว่าการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี โดยเฉพาะในด้านของความจำเพาะต่อแอนติเจน เนื่องจากมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนอื่นน้อยกว่ามาก จึงนิยมใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในวินิจฉัยโรค โดยตรวจหาแอนติเจนของจุลชีพที่ต้องการในโรคติดเชื้อต่างๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส และปรสิต ในการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะของมะเร็งบางชนิด ในการตรวจวัดระดับฮอร์โมนชนิดต่างๆ เป็นต้น (สุทธิพันธ์ สารสมบัติ และคนอื่นๆ. 2537 : 376)

ศัพท์ที่ 5 Indirect peroxidase immunohistochemistry

เทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน ซึ่งก็คือ เชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมภายในเนื้อเยื่อของสัตว์ อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อกัน โดยเทคนิคนี้เป็นแบบวิธีอ้อม (indirect) คือใช้แอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ horseradish peroxidase มาจับกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง จากนั้นเติมสับสเตรต คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และสารที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ได้แก่ 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ปฏิกิริยาที่ได้เกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase (HRP) กลายเป็นผลิตภัณฑ์ (product) ได้แก่ ออกซิเจน (O_2) และน้ำ (H_2O) ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB เปลี่ยนสภาพจากสารละลายเป็นตะกอนจับอยู่ที่บริเวณแอนติบอดีจับกับแอนติเจน ทำให้เกิดการติดสีบริเวณที่มีแอนติเจนอยู่ หลังจากนั้นจึงย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีอีมาทอกไซลินซึ่งจะติดสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียสและอีโอซิน ซึ่งจะติดสีแดงบริเวณไซโทพลาสซึมทำให้สามารถมองเห็นและระบุชนิดเนื้อเยื่อโดยรอบได้ ซึ่งวิธีนี้ยังช่วยให้เพิ่มความไวในการติดสี เนื่องจากมีแอนติบอดีตัวที่สองจำนวนมากสามารถจับแอนติบอดีตัวที่หนึ่งแต่ละตัว จึงเป็นการเพิ่มจำนวนโมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ตำแหน่งที่แอนติบอดีจับอยู่และไม่เกิดความยุ่งยากต่อการนำเอนไซม์ไปติดกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่ผลิตและมีปริมาณอยู่จำกัดด้วย (ยัยนั บ แวและ. 2545 : 5. ; วีระวรรณ สิทธิกรกุล. 2542 : 291-293)

ศัพท์ที่ 5 RT- PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction)

RT- PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) คือ การนำเทคนิค PCR มาใช้ตรวจวิเคราะห์ RNA โดยขั้นตอนสำคัญเริ่มต้นด้วยการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสัตว์ตัวอย่าง แล้วใช้ RNA นี้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription ให้สังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) จากนั้นจะใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer 2 สาย ที่สังเคราะห์มาเพื่อขยายตำแหน่งที่สนใจบน cDNA นั้น ซึ่งได้แก่ primer 10F (Forward primer :5'CCGCTAATTTCAAAAACACTACG3') และ primer 144R (Reverse primer :5'AAGGTGTTATGTCGAGGAAG3') (Wongteerasupaya, et al. 1997 : 183) ผลผลิต PCR (PCR product) ที่ขยายจำนวน cDNA สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งคาดว่าผลผลิตที่จะได้จากการทดลองนี้ เมื่อตรวจพบไวรัสหัวเหลี่ยมจะพบแถบปรากฏอยู่ในช่วง 135 คู่เบส (base pair) โดยเทียบกับ molecular weight marker ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

สมมติฐานการวิจัย

สัตว์ชนิดต่างๆที่อาศัยอยู่ในแหล่งเลี้ยงกิ้งกูดล่าดำ รวมทั้งสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารสดสำหรับเลี้ยงลูกกิ้งกูดอาจมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมตามธรรมชาติ และอาจสามารถติดเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมจากการทดลอง ซึ่งคาดว่าสัตว์เหล่านี้อาจจะมีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus ; YHV)

จากการศึกษาด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) ซึ่งเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี negative stain ที่ย้อมด้วยสารละลาย uranyl acetate พบอนุภาคของไวรัสหัวเหลืองมีรูปร่างแบบแท่ง (bacilliform) ขนาด $50-60 \times 190-200$ นาโนเมตร ภายในเป็น nucleocapsid มีเปลือกหุ้ม (envelope) ยื่นออกเป็นปุ่มปมหรือหนาม (spikes) (Nadala, Tapay & Loh. 1997 : 142-143) เมื่อศึกษาด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าไวรัสนี้มีสารพันธุกรรมหรือจีโนม (genome) เป็นชนิด ssRNA (Wongteerasupaya, et al. 1995 : 49) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) พบว่าประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 170 135 67 และ 22 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วย Western blot โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี พบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนัก 135 กิโลดาลตัน เป็น glycosylated protein (Nadala, Tapay & Loh. 1997 : 144 - 145)

ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ต่าง ๆ ในไฟลัม Arthropoda, Mollusca และ Annelida

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Atyidae เช่น กุ้งกะปิ

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Atyidae

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

ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Artemiidae เช่น ไรน้ำเค็ม (brine shrimp)

ไรน้ำเค็มหรือไรสีน้ำตาลเป็นครัสเตเชียนขนาดเล็ก สามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็ม (salinity) ต่ำ จนกระทั่งในน้ำที่มีระดับความเค็มสูงได้ แต่ไม่พบในทะเลเปิด ไรน้ำเค็มเหล่านี้นิยมใช้เป็นอาหารของพวกลูกกุ้งที่อยู่ในระยะตัวอ่อนที่ไม่สามารถกินอาหารชิ้นโตๆ ได้ โดย

นำเอาไข่ของไรน้ำเค็มมาพักในน้ำทะเลที่มีความเค็มประมาณ 30-35 ppt. ประมาณ 2-3 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนใช้เป็นอาหารเลี้ยงลูกกุ้งได้ (บพิธ จารุพันธ์. 2529 : 46)

ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Daphnidae เช่น ไรแดง

ไรแดงเป็นไรน้ำที่พบทั่วไป ตามบ่อ คูต่างๆ เมื่อรวมกันมากๆ จะเห็นเป็นสีแดง เนื่องจากสารพวกฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ซึ่งอยู่กระจัดกระจายทั่วร่างกาย จึงเรียกชื่อสามัญว่า ไรแดง สารฮีโมโกลบินนี้จะมีปริมาณมากเมื่อน้ำในบริเวณนั้นมีออกซิเจนน้อย ถ้ามีออกซิเจนมาก ปริมาณของฮีโมโกลบินจะน้อย ดังนั้นในน้ำที่สะอาดจะพบว่าไรพวกนี้มีสีน้ำตาลอ่อนๆ แต่ในน้ำเน่าๆ จะเห็นว่าไรแดงเข้มชัดเจนมาก ไรแดงเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เนื่องจากนิยมใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนและพวกลูกปลาต่างๆ (บพิธ จารุพันธ์. 2529 : 50)

ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Gammaridae เช่น แอมฟิพอด

Gammarus หรือแอมฟิพอด มีลักษณะตัวแบนโค้งงอเหมือนกุ้ง แต่ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนหัวของกุ้ง ขนาดทั่วไปยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร เท่านั้น อาศัยอยู่ในน้ำจืดหรือน้ำกร่อย โดยอยู่ตามหน้าดิน (บพิธ จารุพันธ์. 2529 : 77)

ลักษณะของสัตว์ในวงศ์ Chironomidae เช่น หนอนแดง

หนอนแดง เป็นตัวอ่อนของแมลงชนิดหนึ่ง ชาวบ้านเรียกว่า รึ้นน้ำจืด (midge) ลักษณะของรึ้นน้ำจืดมีรูปร่างคล้ายยุงตัวผู้มีหนวดงามแบบพู่ขนนก (plumose) ส่วนหัวเล็กขอบหดเข้าไปอยู่ในส่วนอก ตัวยาว ประมาณ 8-10 มิลลิเมตร มักอยู่เป็นฝูงใกล้ผิวน้ำและใกล้แสงสว่าง ตัวเมียชอบวางไข่ในน้ำที่ลมสงบเฉลี่ยตัวละ 2,300 ฟอง ไข่จะฟักเป็นตัวหนอนภายในเวลา 3-4 วัน ตัวหนอนจะมีสีแดงจึงเรียกว่า หนอนแดง ลำตัวยาว ประมาณ 3-18 มิลลิเมตร ส่วนหัวแบ่งแยกจากลำตัวเห็นได้ชัด มีตาเป็นจุดสีดำเล็กๆ 1 คู่ มีขนเล็กๆ สำหรับกวาดอาหารเข้าสู่ปาก มีฟันและกรามที่แข็งแรง อาหารของหนอนแดงคือ อินทรีย์วัตถุที่เน่าสลาย (detritus) ส่วนอกจะขยายใหญ่มีอวัยวะหายใจยื่นยาวออกมาเป็นท่อเล็กๆ 1 คู่ บางชนิด (species) จะมีลักษณะเป็นสายยาว ลำตัวแบ่งเป็น 12 ปล้อง 3 ปล้องแรกรวมกันเรียกว่า cephalothorax ตัวอ่อนเมื่ออายุได้ 10-12 วัน จะสร้างปลอก (tube) หุ้มตัวโดยใช้โคลนและเศษอินทรีย์วัตถุที่ย่อยสลายในน้ำ ปลอกนี้จะช่วยยึดส่วนอก และขาเทียม 2 คู่ ที่อยู่บริเวณท้อง ช่วยขึงลำตัวและป้องกันไม่ให้กระแสน้ำผ่านเข้าออก และเป็นทางรับปริมาณออกซิเจน หนอนแดงจะอาศัยอยู่ในปลอกนี้นาน 6-8 วัน ระยะนี้เรียกว่า ระยะก่อนเข้าดักแด้ (prepupa) เมื่อครบกำหนดหนอนแดงจะสลัดปลอกทิ้งเข้าสู่ระยะดักแด้ (pupa) ซึ่งมีลักษณะคล้ายลูกน้ำยุง เรียกว่า ไ้ไม่่ง แต่มีสีแดงคล้ำ ระยะนี้ 1-2 วัน โดยจะลอยตัวในแนวตั้งตั้งฉากกับผิวน้ำ หลังจากนั้นจึงลอกคราบเปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย เรียกว่า รึ้นน้ำจืด วงจรชีวิตของแมลงชนิดนี้ประมาณ

21-28 วัน รึ้นน้ำจืดในประเทศร้อนจะมีวงจรชีวิตสั้นกว่ารึ้นน้ำจืดในประเทศแถบหนาว หนอนแดงมีความสำคัญต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ใช้เป็นอาหารลูกกุ้งวัยอ่อน เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (จำนง ธีรวุฒิ. 2546 : ออนไลน์)

ลักษณะของแมงดาทะเลในวงศ์ Limulidae เช่น แมงดาหางกลม

อาศัยอยู่ในน้ำกร่อยหรือน้ำทะเลทั้งสิ้น ระวังค์ต่างๆ คล้ายกับระวังค์ของแมงป่อง ลำตัวแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ prosoma กับ opisthosoma ซึ่ง prosoma จะกว้างโค้งกลมทางด้านหน้า มีบานพับเชื่อมระหว่าง prosoma กับ opisthosoma ปล้องต่างๆ จะเชื่อมทางด้านหลัง พบในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ แมงดาจานหรือแมงดาหางเหลี่ยม (*Tachypieus gigas*) กับแมงดาถ้วยหรือแมงดาไฟหรือแมงดาหางกลมหรือเหรา (*Carsinoscorpius rotundicauda*) ที่พบส่วนมากจะเป็นแมงดาถ้วยซึ่งอาศัยอยู่ตามหาดโคลนทั่วไป (บพิธ จารุพันธ์. 2529 : 112)

ลักษณะของไส้เดือนในวงศ์ Lumbriculidae เช่น ไส้เดือนแดง

นักชีววิทยาจัด *Lumbriculus variegates* ให้อยู่ในพวก Oligochaete ที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด ซึ่งได้จำแนกจากลักษณะทางชีววิทยา ได้แก่ การงอกใหม่ (regeneration) เมื่อมีชิ้นส่วนของลำตัวขาดหายไป ระบบหมุนเวียนเลือด ปฏิกริยาต่อการว่ายน้ำ การสืบคลาน การทำงานของระบบประสาท ความไวต่อสารเคมีบางอย่างหรือสิ่งแวดล้อม (Drewes. 2003 : Online)

ลักษณะของแมลงปอในวงศ์ Agrionidae เช่น ตัวอ่อนแมลงปอเข็ม

แมลงปอเข็ม (Damselflies) เป็นแมลงที่มีรูปร่างเรียวกว่าแมลงปอ บินไม่ค่อยเร็ว ส่วนอกโดยเฉพาะ Metathorax ขูขึ้นคล้ายรูปสามเหลี่ยมและเอียงไปทางด้านหลังทำมุม 70-80 กับแกนความยาวของลำตัว ปีกคู่หน้าและคู่หลังมีรูปร่างคล้ายคลึงกัน โคนปีกมีขนาดเรียวเล็กกว่าปลาย ปีกเวลาพับปีกจะหุบติดกันชูเหนือลำตัว และมักวางขนานกับแกนความยาวของลำตัว ตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะรูปร่างของปีกเหมือนกันปกติหัวของแมลงปอเข็มค่อนข้างยาวตามขวางไม่กลมตัวผู้มีระวังค์ที่ส่วนท้ายของท้อง 4 อัน 2 อันด้านบนเป็น Cercus อีก 2 อันด้านล่างเป็น Paraproct ตัวเมียมี Ovipositor จึงทำให้ส่วนท้ายสุดของตัวเมียพองกว่าปกติ ตัวอ่อนมีเหงือกรูปใบไม้ 3 อันอยู่ที่ส่วนท้ายของท้อง และมักเกาะอยู่บนต้นพืชมากกว่าอยู่ตามพื้นล่างของแหล่งน้ำ (ไพฑูรย์ สุขศรีงาม. 2521 : 85)

ลักษณะของหอยในวงศ์ Muricidae เช่น หอยมะระ

ลักษณะทั่วไปของหอยในวงศ์ Muricidae

เปลือกมีขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ โดยทั่วไปมักจะหนาและแข็ง รูปร่างเปลือกเป็นรูปกระสวยเนื่องจากเปลือกด้านหน้ามีร่องไซฟอน (siphon) ยาว ขอบปากเปลือกอาจเรียบหรือเป็นหยักและมีรูปร่างกลม บอดี้เวิร์ล (body whorl) ใหญ่ ผิวเปลือกขรุขระเต็มไปด้วยตุ่มหรือหนามแหลม ยาว โอเพอร์คิวลัม (operculum) เป็นมันเงาและหนา พบในน้ำเค็ม ชอบอยู่บริเวณน้ำตื้นระหว่างโขดหิน หรือฝังตัวอยู่ในพื้นโคลนและพื้นทราย หรืออาจอยู่ใต้ก้อนหินหรือบนปะการัง ชอบกินสัตว์อื่นเป็นอาหาร บางชนิดเป็นศัตรูสำคัญของหอยนางรม หอยที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Murex* Linnaeus, *Rapana* Schumacher, *Mancinella* Link, *Chicoreus* Montfort, *Thais* Roding, *Muricopsis* Bacquoy Dautzenberg & Dollfuss, *Naquetia* Jousseaume, *Pterpynotus* Swainson, *Purpura* Bruguiere, *Nassa* Roding, *Drupa* Roding, *Drupella* Thiele และ *Morula* Schumacher (สุชาติ อุปถัมภ์ และคนอื่นๆ. 2538 : 149)

ลักษณะของหอยในวงศ์ Thiaridae เช่น หอยเจดีย์1 (*Melanoides tuberculata*)

และหอยเจดีย์2 (*Sermyla riqueti*)

ลักษณะทั่วไปของหอยในวงศ์ Thiaridae

เปลือกทรงกรวยยาวหรืออาจเป็นทรงกรวยรูปไข่ ผิวเปลือกไม่เรียบอาจเป็นสันหรือลวดลายนูนหรือขรุขระ สไปร์ (spire) มักจะสีกร่อน โอเพอร์คิวลัมบาง เป็นมัน และเป็นแบบพอซีสไปรัล (paucispiral) หรือมัลติสไปรัล (multispiral) หอยเพศเมียออกลูกเป็นตัว ฝังตัวอ่อนจะอยู่ใต้ช่องลำตัวบริเวณคอและรูเปิดทางด้านขวาของคอ พบในทวีปยุโรปตอนใต้ แอฟริกา เอเชีย อเมริกาใต้ ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำจืด หอยที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Brotia* Adams, *Paracrostoma* Cossmann, *Thiara* Roding, *Melanoides* Olivie, *Tarebia* Adams, *Sermyla* Adams (สุชาติ อุปถัมภ์ และคนอื่นๆ. 2538 : 142)

การศึกษาเกี่ยวกับไวรัสหัวเหลือง

ไชยยุทธ จันทนชุกลินและคนอื่นๆ (Chantanachookin, et al. 1993 : 145) ได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลือง โดยเก็บตัวอย่างจากบ่อกุ้งที่มีการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองจากในสวนภาคใต้ของประเทศไทย ช่วงประมาณเดือนกุมภาพันธ์และสิงหาคม ในปี ค.ศ.1992 แล้วนำกุ้งที่ป่วยด้วยโรคไวรัสหัวเหลืองมาตรวจดูเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงพบว่าบริเวณส่วนหัวและอก เมื่อมองเห็นผ่านคาราเพสจะมีสีเหลือง เนื่องจากที่อวัยวะส่วนตับและตับอ่อนติดเชื้อและเกิดลักษณะสีเหลือง นอกจากนี้ยังพบลักษณะของเนื้อเยื่อของอวัยวะน้ำเหลือง มีลักษณะผิดปกติอย่างชัดเจน มีการตายของเซลล์แบบ necrosis คือ พบเซลล์นิวเคลียสบวมโตอยู่ภายในเซลล์แควโอล และพบ inclusion มีลักษณะกลมอยู่ภายในไซโทพลาสซึมที่ติดสีเบสอยู่ใกล้กับนิวเคลียสที่บวมโต นอกจากนี้ยังพบ inclusion ลักษณะเดียวกันบริเวณส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ทางเดินอาหารส่วนกลาง กล้ามเนื้อหัวใจ เนื้อเยื่อเหงือก และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ไม่เหมือนกับโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือปรสิต เมื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) จะเห็นอนุภาคของไวรัสหัวเหลืองมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shaped virus) มีเนื้อเยื่อหุ้มไวรัสอยู่ในไซโทพลาสซึมที่ติดกับนิวเคลียสของเซลล์เนื้อเยื่อหลายชนิด และจะพบอนุภาคไวรัสตามส่วนที่แยกอยู่เป็นอิสระในส่วนที่ว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งลักษณะไวรัสหัวเหลืองมีความคล้ายคลึงกับ granulosis virus ซึ่งเป็นไวรัสในวงศ์ Baculoviridae ของสัตว์จำพวกแมลง

ลู, ทาเปย์ และโลห์ (Lu, Tapay & Loh. 1995 : 67) รายงานถึงการแพร่กระจายเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ รวมถึงพิสูจน์ทราบอวัยวะเป้าหมายที่จะเกิดการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสหัวเหลือง เพื่อใช้เป็นแหล่งแรกในการจะแยกเชื้อไวรัสและตรวจวินิจฉัยโรคในโอกาสต่อไป ในการทดลองได้ศึกษาเนื้อเยื่อและอวัยวะ 9 ส่วนของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) โดยทำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการฉีดสารสกัดจากส่วนหัวและอกของกุ้งที่มีเชื้อไวรัสหัวเหลือง แล้วนำส่วนเหงือก เส้นประสาท อวัยวะน้ำเหลือง หัวใจ ทางเดินอาหารส่วนกลาง ตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อส่วนหัว กล้ามเนื้อส่วนท้อง และก้านตา ไปตรวจสอบด้วยวิธี bioassay โดยใช้กุ้ง penaeid เป็นตัวเปรียบเทียบ และทดสอบค่า TCID₅₀ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์อวัยวะน้ำเหลืองของกุ้ง ผลที่ได้พบว่าเนื้อเยื่อและอวัยวะทั้งหมดที่ศึกษามีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง หลังจากนั้นทำการฉีดของเหลวที่ได้จากเนื้อเยื่อและอวัยวะเหล่านี้ให้กุ้งทดลอง พบว่ากุ้งทั้งหมดที่นำไปทดสอบตายภายในระยะเวลา 6-9 วัน และในส่วนการทดสอบค่า TCID₅₀ พบว่า ส่วนอวัยวะน้ำเหลือง เหงือก และเนื้อเยื่อส่วนหัวของกุ้ง มีปริมาณไตเตอร์ของไวรัสหัวเหลืองสูงกว่าเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆตั้งแต่ 10-800 เท่า เพราะฉะนั้นอวัยวะทั้ง 3 ส่วนนี้น่าจะเป็นเป้าหมายแรกในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงควรจะใช้อวัยวะทั้ง 3 ส่วนนี้ในการศึกษาตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองต่อไป

ลู, ทาเปย์ และโลห์ (Lu, Tapay & Loh. 1996 : 9) ได้พัฒนาเทคนิค nitrocellulose enzyme – immunoassay (NC-EIA) ขึ้น เพื่อใช้ตรวจสอบกับกุ้งที่คาดว่าจะได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้แอนติบอดีตัวที่หนึ่ง เป็น polyclonal hyperimmune IgG และใช้แอนติบอดีตัวที่สอง เป็น goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) ส่วนสับสเตรตมี 2 ชนิด ได้แก่ DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) และ TMB (3,3',5,5'-tetramethylbezidine) ส่วนแอนติเจนนั้นใช้เชื้อไวรัสหัวเหลืองซึ่งสกัดจากอวัยวะส่วนเหงือกและส่วนหัวและอกของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากผลการทดลองเมื่อใช้ TMB เป็นสับสเตรตจะให้ผลได้ชัดเจน คือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นให้สีฟ้า ถึงแม้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีเพียงเล็กน้อย เมื่อใช้ DAB เป็นสับสเตรตจะให้ผลจากปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลซึ่งทำให้สังเกตเห็นได้ยาก และต้องใช้ปริมาณโมเลกุลโปรตีนของเชื้อไวรัสหัวเหลืองถึง 0.8 นาโนเมตร ส่วนในการทดสอบความไวของการเข้าทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค NC-EIA สามารถตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในปริมาณไวรัสเพียงแค่ 100 TCID₅₀ เท่านั้น ส่วนในแง่ของการใช้อวัยวะส่วนต่าง ๆ ของกุ้งที่ติดเชื่อนั้น ผลที่ได้พบว่า แอนติเจนที่มาจากเซลล์เหงือกให้ผลการตรวจจากวิธีการ NC-EIA ได้ดีที่สุด และยังแนะนำให้ใช้แอนติเจนจากเหงือกเนื่องจากเตรียมได้ง่ายกว่าอวัยวะอื่นที่เป็นเป้าหมายสำคัญของไวรัสหัวเหลือง

นาดาลา, และคนอื่นๆ (Nadala, et al. 1997 : 39) ทำการวิจัยโดยมีจุดประสงค์เพื่อนำเสนอการพัฒนาเทคนิค Western blot มาปรับใช้ในการตรวจไวรัสในกุ้ง ซึ่งได้แก่ไวรัสหัวเหลือง (YHV) และ chinese baculovirus (CBV) โดยนำกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) มาเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อไวรัส โดยการฉีดไวรัสที่ได้จากสารสกัดเนื้อเยื่อส่วนหัวของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและ CBV หลังจากนั้นนำส่วนของน้ำเลือด มาตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยใช้ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ร่วมอยู่ด้วย ซึ่งสามารถแยกโปรตีน G มีน้ำหนักโมเลกุล 135 กิโลดาลตัน และโปรตีน L มีน้ำหนักโมเลกุล 170 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสหัวเหลืองได้อย่างชัดเจนที่เวลา 64 ชั่วโมง หลังจากฉีดไวรัส ส่วนในการตรวจสอบเชื้อไวรัส CBV พบแถบ nucleocapsid ของไวรัส เกิดขึ้นทั้งหมด 3 แถบที่เวลา 41 และ 43 ชั่วโมง หลังจากการฉีดไวรัส โดยที่กุ้งทดลองเหล่านั้นยังไม่แสดงอาการป่วย จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 จึงจะสังเกตอาการป่วยได้ และนอกจากนี้ยังได้ใช้วิธี Western blot ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออวัยวะน้ำเหลือง ซึ่งสามารถแสดงผลภายในระยะเวลา 4 วันหลังจากการติดเชื้อ โดยให้ผลลักษณะเดียวกันกับการตรวจจากน้ำเลือด ด้วยวิธี gel electrophoresis สรุปได้ว่า ข้อดีของเทคนิค Western blot คือ ให้ความแม่นยำ รวดเร็วและไวต่อปริมาณไวรัส ถึงแม้ว่ากุ้งจะยังไม่แสดงอาการป่วยเลยและในยังตรวจสอบหาเชื้อไวรัสในเลือดของสัตว์ทดลองได้โดยที่สัตว์ไม่เสียชีวิต

นาดาลา, ทาเปย์ และโลห์ (Nadala, Tapay & Loh. 1997 : 141) รายงานว่าไวรัสหัวเหลืองเป็นไวรัสที่มีความรุนแรงสูงต่อกุ้ง panaeid ซึ่งไวรัสนี้แยกได้มาจากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

จากประเทศไทย โดยในระยะแรกรายงานว่าเป็นไวรัสกลุ่ม baculovirus และมีการรายงานที่ขัดแย้งว่าเป็นไวรัสที่มี RNA เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงทำการวิจัยเพื่อพิสูจน์หาข้อสรุปเรื่องดังกล่าว โดยได้ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากกุ้งที่ติดเชื้อโรคหัวเหลือง โดยทดลองการติดเชื้อด้วยการฉีดเชื้อไวรัส ที่เตรียมจากอวัยวะส่วนเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ทำการเก็บตัวอย่างใน 3-4 วัน และหลังจากนั้นเตรียมเชื้อจากส่วนเหงือก เนื้อเยื่อส่วนหัว และน้ำเลือด ทำการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยวิธี SDS-PAGE analysis พบโครงสร้างโปรตีนอย่างน้อย 4 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 170 135 67 และ 22 กิโลดาลตัน และทำวิธี Western blot โดยใช้ polyclonal anti-YHV IgG พบการเกิดแถบทั้งหมด 4 แถบ โดยที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 135 กิโลดาลตัน มีความเข้มข้นสูงที่สุดและเกิดปฏิกิริยากับ anti-YHV antibodies ขณะที่ anti-YHV IgG นี้ ไม่ทำปฏิกิริยากับโครงสร้างโปรตีนของไวรัสอื่น ซึ่งได้แก่ rhabdovirus of panaeid shrimp (RPS) และ vesicular stomatitis virus (VSV) นอกจากนี้ จากการทดสอบด้วย glycoprotein labeling ยังพบว่าที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 135 กิโลดาลตัน เป็นสารจำพวก glycosylate

นอกจากนี้ยังทดลองยืนยันว่าเชื้อไวรัสหัวเหลือง มีกรดนิวคลีอิกเป็น RNA สายเดี่ยว (ssRNA) และเป็นสายลบขนาดประมาณ 22 คู่เบส โดยตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ RNase ซึ่งพบว่า แถบ RNA ที่ 22 คู่เบสสามารถย่อยสลายเมื่อใช้เอนไซม์ RNase และเมื่อตรวจดูด้วย TEM แล้วจะพบอนุภาคของไวรัสหัวเหลือง มีเปลือกหุ้ม (envelope) มีลักษณะรูปร่างของไวรัสแบบ bacilliform ขนาดประมาณ 50-60 x 190-200 นาโนเมตร ด้านในเป็น helical nucleocapsid ติดกับเปลือกหุ้มและมีสาย peplomer หรือ ปุ่มหนาม (spikes) ยื่นออกโดยรอบ อนุภาคไวรัสมีความยืดหยุ่นสูงซึ่งสังเกตจากการพบรูปร่างอนุภาคต่างๆออกไปเป็นจำนวนมากและบางกลุ่มมีการถูกทำลายซึ่งอาจเนื่องจากโครงสร้างแตกหักง่ายเช่นกัน สุดท้ายได้ทดลองนำไวรัสหัวเหลือง และ vesicular stomatitis virus (VSV) ไปทดลองหาการจับตัวของเม็ดเลือด (hemagglutination) พบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดจับตัวกับเซลล์เม็ดเลือดทำปฏิกิริยากันแน่น ไม่หลุดออกนานเกิน 24 ชั่วโมง จึงสรุปได้ว่าไวรัสไม่มี receptor ในการทำลายของเอนไซม์ จึงสรุปว่าเชื้อไวรัสหัวเหลือง มีคุณสมบัติต่างๆ เหมือนในไวรัสกลุ่ม rhabdovirus จึงน่าจะจัดอยู่ใน rhabdovirus

ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ และคนอื่นๆ (Wongteerasupaya, et al. 1997 : 181) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยใช้เทคนิค RT-PCR ให้มีความแม่นยำ รวดเร็วและสะดวกมากยิ่งขึ้น โดยเตรียมตัวตรวจสอบกรดนิวคลีอิกที่ได้จาก cDNA ซึ่งสกัดจาก ssRNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง ตัวตรวจสอบที่มีความจำเพาะนี้สร้างขึ้นได้จากการใช้เทคนิค dot-blot hybridization เปรียบเทียบกับกรดนิวคลีอิกที่ได้จากเชื้อโรคหัวเหลืองในกุ้ง แบคทีเรียหรือไวรัสอื่นจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ (primer) ให้ใช้กับปฏิกิริยา RT-PCR ที่ขนาด 135 คู่เบส เพื่อใช้ในการตรวจสอบ RNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง เมื่อนำไปทำ

ปฏิกิริยา RT-PCR กับตัวต้นแบบของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสและเชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์ หรือกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาด 135 คู่เบส ตามที่คาดหวัง ในทางตรงข้ามการทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิกของกุ้งปกติหรือกุ้งที่มีเชื้อโรคอื่น ๆ นั้นไม่ให้ผลผลิตใดๆ ซึ่งผลที่ออกมาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความแม่นยำในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ RNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง นอกจากนี้เทคนิค RT-PCR มีความไวสูงเนื่องจากสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้แม้จะมีปริมาณ RNA ในไวรัสเพียงเล็กน้อยแค่ 0.01 พิโคกรัม และในแง่ของความเร็วนั้นเทคนิคนี้สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในเวลาแค่เพียง 6 ถึง 12 ชั่วโมง หลังการรับเชื้อแต่ในขณะที่เทคนิคทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ (histopathology) จะเห็นผลได้นั้นต้องใช้เวลารวสอบหลังการติดเชื้อ 42 ถึง 48 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นเทคนิค RT-PCR จึงมีประโยชน์ในการตรวจสอบการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองได้ในระยะแรกที่กุ้งได้รับเชื้อก่อนที่จะเกิดอาการป่วย แต่อย่างไรก็ตามอุปสรรคของเทคนิคนี้ก็คือ ต้องเสียค่าใช้จ่ายที่สูงและบุคลากรต้องมีความเชี่ยวชาญในการที่จะนำเทคนิคนี้ไปใช้

โคว์เลย์ และคนอื่นๆ (Cowley, et al. 1999 : 153) ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของบริเวณหน่วยพันธุกรรม จากการแยกจีโนมของเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากประเทศไทยและ gill-associated virus (GAV) จากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งใช้วิธีการตรวจสอบทาง RT-PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบสหรือลำดับกรดอะมิโน (sequence analysis) โดยได้ออกแบบลำดับ PCR primer จากส่วน ORF1b polyprotein gene ของเชื้อไวรัส GAV พบว่ามีความสัมพันธ์ตรงกันกับลำดับจีโนมของเชื้อไวรัสหัวเหลืองทั้งหมด 577 นิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบจากบริเวณที่ตรงกันของส่วนนิวคลีโอไทด์ มีประมาณ 85.1 % และส่วนลำดับกรดอะมิโน มีประมาณ 95.8 % โดยเมื่อเปรียบเทียบการรายงานผลของคณะวิจัยอื่นก่อนหน้านี้ ซึ่งได้กำหนด YHV PCR primer ในการเพิ่มผลผลิต ได้ผลผลิต 135 นิวคลีโอไทด์ เมื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองพบว่าไม่สามารถเพิ่มผลผลิตที่ตรงกันกับเชื้อไวรัส GAV ได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยอื่นที่ทำการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัส GAV และไวรัสหัวเหลือง ตรงบริเวณเหนือขึ้นไปจากยีน ORF1b พบว่าในส่วนระดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันถึง 83 และ 80.9 % ตามลำดับ และระดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกัน 89.7 และ 86.5 % ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัส GAV และไวรัสหัวเหลือง มีความคล้ายคลึงกันแต่เป็นไวรัสคนละชนิด

ไพศาล สิทธิกรกุล และคนอื่นๆ (Sithigorngul, et al. 2000 : 27) สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองได้สำเร็จ โดยปลูกภูมิคุ้มกันให้แก่หนูเมาส์ด้วยสารสกัดของเหงือกกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว คือ V3-2B ซึ่งเป็น clone ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองอย่างสูง สามารถจับไวรัสหัวเหลืองได้ทั้ง native antigen และ SDS-treated viral specific antigen และสามารถใช่วิธี immunohistochemistry ในการตรวจพบไวรัสหัวเหลืองที่ไซโทพลาสซึม ของเนื้อเยื่อเหงือกและเม็ดเลือด (haemocyte) ของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แต่ไม่พบปฏิกิริยาการจับระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนในเนื้อเยื่อของกุ้ง

ปกติ ทั้งยังสามารถใช้ V3-2B และวิธี immunohistochemistry ในการตรวจสอบไวรัสหัวเหลือง ใน กุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในขณะที่เนื้อเยื่อกุ้งกลุ่มควบคุมหรือกุ้งปกติที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสตัวแดง ดวงขาวไม่พบการติดเชื้อ นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot พบว่า แอนติบอดีทำ ปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้เฉพาะในกุ้งที่ได้รับ เชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่านั้น

ไพศาล สิทธิกรกุล และคนอื่นๆ (Sithigorngul, et al. 2002 : 71) สามารถผลิตโมโน โคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนของไวรัสหัวเหลือง สามารถแบ่งโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ได้ออกเป็น 4 กลุ่ม แอนติบอดีกลุ่มแรกสามารถจับกับ native protein ของไวรัสหัว เหลือง ส่วนแอนติบอดีสามกลุ่มที่เหลือสามารถทำปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่มีน้ำหนัก โมเลกุล 22, 67 และ 135 กิโลดาลตัน ทั้งในรูป native form และ denatured form แอนติบอดี ทั้งหมดสามารถใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี dot blot และ วิธี immunohis - tochemistry

การศึกษาเกี่ยวกับพาหะของโรคไวรัสหัวเหลือง

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มียาหรือสารเคมีชนิดใดๆ ที่สามารถรักษาโรคไวรัสที่เกิดกับกุ้งได้เลย ทำให้นักวิจัย ผู้ประกอบการและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้พยายามศึกษาค้นคว้าและวิจัยเกี่ยวกับโรค กุ้ง ซึ่งปัจจุบันมีเพียงวิธีการป้องกันการระบาดของโรค เช่น การตรวจหาเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์ และ ลูกกุ้งด้วยวิธี RT-PCR ก่อนจะปล่อยลูกกุ้งลงไปในบ่อเลี้ยง การจัดระบบการจัดการบ่อที่ดี การแยก อุปกรณ์การเลี้ยง หลีกเลี่ยงการให้อาหารสดและการกำจัดสัตว์ที่เป็นพาหะหรือที่อาจเป็นพาหะเพื่อ ไม่ให้เข้าไปอยู่อาศัยในบ่อกุ้ง

การศึกษาเกี่ยวกับพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองยังมีรายงานน้อย ส่วนใหญ่มีรายงานถึงไวรัส ตัวแดงดวงขาวเพราะศึกษาได้ง่ายกว่า เนื่องจากไวรัสตัวแดงดวงขาวมีจีโนมเป็น DNA โดยในปี 1996 Lo และคนอื่นๆ ได้ใช้และพัฒนาเทคนิค one step PCR และ two step PCR เพื่อตรวจหา ไวรัสตัวแดงดวงขาวจากสัตว์ในบ่อเลี้ยง พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) กุ้งกุลูมา (*P. japonicus*) กุ้งหางแดง (*P. penicillatus*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) และปูทะเล (*Scylla serrata*) และจากการ สืบรวจจากแหล่งธรรมชาติ พบว่ามีสัตว์บางส่วนมีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติอยู่ แล้ว นอกจากนี้ยังตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตามธรรมชาติในพวกครัสเตเชียชนิด อื่นๆ ได้แก่ ปูกางเขน (*Charybdis feriatus*) ปูม้า (*Portunus pelagicus*) ปูสามจุด (*P. sanguinolentus*) ไรน้ำกลุ่มโคพิพอด (*Helice tridens*) และกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ชนิดต่างๆ ซึ่งเชื่อว่าครัสเตเชียเหล่านี้ อาจจะเป็นพาหะและเป็นแหล่งสะสมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่ กุ้งกุลาดำในแหล่งเพาะเลี้ยงได้

กิจการ สุภมาตย์ และคนอื่นๆ (Supamattaya, et al. 1998 : 79) ศึกษาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในครัสเตเชีย 3 ชนิด ได้แก่ กุ้งเคย ปูม้า (*Portunus pelagicus*) และปูทะเล (*S. serrata*) ซึ่งทำการทดลอง 3 วิธี โดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว การฉีด และการจุ่มเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ใช้ฉีดและจุ่มได้สกัดมาจากเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเช่นกัน แล้วตรวจผลการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย TEM คุณลักษณะของเนื้อเยื่อ พบว่า สัตว์ทดลองสามารถติดเชื้อไวรัส และจากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PCR และ *in situ* hybridization สามารถสรุปได้ว่า สัตว์ทดลองบางชนิดหลังจากได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวแล้ว สามารถมีชีวิตอยู่ได้ระยะหนึ่ง จึงคาดว่าสัตว์เหล่านี้น่าจะเป็นพาหะที่สามารถแพร่เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปสู่กุ้งได้

ซาฮูล ฮามีด, ชาลีส์ และแอนนิคุมมา (Sahul Hameed, Charies & Anikumar. 2000 : 207) ได้ศึกษาและตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งน้ำจืด 3 ชนิด ได้แก่ *Macrobrachium idella* *M. lamerrae* และกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) โดยการทดสอบ 3 วิธี คือ การใส่เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวลงในน้ำที่เลี้ยง การให้กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และการฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้ากล้ามเนื้อโดยตรง ซึ่งได้ทดลองเปรียบเทียบกับกุ้งน้ำเค็ม 2 ชนิด ได้แก่ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งแชบ๊วย (*P. indicus*) พบว่า อัตราการตายของกุ้ง *M. idella* กับ *M. lamerrae* ที่เลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงเป็น 43.3% และ 53.3% ตามลำดับ การให้กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ทำให้กุ้ง *M. idella* กับ *M. lamerrae* มีอัตราการตายเป็น 53.3% และ 66.7% ตามลำดับ ส่วนวิธีฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเข้ากล้ามเนื้อโดยตรง ทำให้กุ้งมีอัตราการตายถึง 100% ในกุ้ง *M. idella*, *M. lamerrae*, *P. monodon* และ *P. indicus* จากการนำกุ้งที่กำลังจะตายมาตรวจหาไวรัสตัวแดงดวง โดยวิธี Western blot หรือทาง histopathology พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวง ในกุ้งน้ำเค็มและกุ้งน้ำจืดได้ ยกเว้นกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) เท่านั้น ซึ่งกลไกของความทนทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงของกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ยังไม่เป็นที่ทราบ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไป

ยัยนั บ แวและ (2545 : บทคัดย่อ) ทำการทดลองตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติและจากการทดลองของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำเค็ม (*Palaemon serrifer*) กุ้งกะเปาะ (*Palaemon styliferus*) กุ้งกะต้อม (*Macrobrachium sintangense*) กุ้งฝอย (*M. lanchesteri*) กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) และกุ้งในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ กุ้งตะกาด (*Metapenaeus affinis*) กุ้งหัวมันหรือกุ้งหัวเหลือง (*Metapenaeus brevicornis*) และกุ้งวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) โดยวิธีฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส ทดสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัสหัวเหลือง คือ V3-2B, Y18-2D และ Y19 แล้วตรวจการติดเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งที่นำมาจากธรรมชาติทั้ง 3 วงศ์ ส่วนกุ้งในวงศ์ Penaeidae คือ *M. affinis* บางส่วนเท่านั้นที่พบติดเชื้อจากการกินซึ่งส่วนใหญ่จะมีการติดเชื้ออย่างรุนแรงเมื่อได้รับ

การฉีด สำหรับกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ทุกชนิดไม่มีการติดเชื้อด้วยการกิน แต่ในการฉีดพบ *M. rosenbergii* เพียง 1 ตัว จากทั้งหมด 21 ตัว และ *M. lanchesteri* ส่วนน้อยที่แสดงการติดเชื้อ แต่ *M. sintangense* และ *Palaemon styliiferus* ส่วนใหญ่มีการติดเชื้อแต่ไม่รุนแรง ขณะที่ *Palaemon serrifer* และ *Caridina* sp. ไม่พบการติดเชื้อเมื่อได้รับเชื้อโดยการกิน และฉีดไม่ได้เนื่องจากตัวขนาดเล็ก จึงไม่ได้ทดลองด้วยวิธีฉีด จากการทดลองพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 135 กิโลดาลตัน แสดงการติดสีปริมาณน้อยแตกต่างชัดเจนจากแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 67 และ 22 กิโลดาลตัน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับความสามารถในการทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกลุ่มนี้บางชนิด

สุดา ชูถิ่น (2547 : บทคัดย่อ) ทำการตรวจสอบของโรคไวรัสหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium* ได้แก่กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) กุ้งฝอย (*M. lanchesteri*) กุ้งกะต๋อม (*M. sintangense*) กุ้งกะต๋อม (*M. equidens*) โดยศึกษาการติดไวรัสโรคหัวเหลือง 3 แบบ การทดลองคือ การตรวจสอบการติดเชื้อในกุ้งธรรมชาติ การติดเชื้อโดยการฉีดด้วยไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 30 วัน และการติดเชื้อจากการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองแล้วเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 67 และ 22 กิโลดาลตัน แล้วตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR ผลจากการตรวจสอบไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งจากธรรมชาติทุกชนิดจากการตรวจสอบทั้งสองวิธี ซึ่งการทดลองโดยการฉีดด้วยไวรัสหัวเหลืองในกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการตรวจทั้งสองวิธีในทุกช่วงเวลาการทดลอง ส่วนกุ้งฝอย (*M. lanchesteri*) พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในวันที่ 3 (1/10, 3/20) กุ้งกะต๋อม (*M. sintangense*) พบการติดเชื้อหลังการฉีดไวรัสหัวเหลืองในวันที่ 3 (20/20) วันที่ 10 (20/20) และพบว่าการติดเชื้อลดลงหลังฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง 30 วัน (6/17) กุ้งกะต๋อม (*M. equidens*) พบการติดเชื้อหลังการฉีดไวรัสหัวเหลืองในวันที่ 3 (7/13) วันที่ 10 (1/12) ส่วนการทดลองให้กุ้งตัวอย่างที่กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดไวรัสหัวเหลือง พบว่าในกุ้งฝอย (*M. lanchesteri*) พบการติดเชื้อในวันที่ 20 (4/20) และ 30 (2/20) กุ้งกะต๋อม (*M. sintangense*) พบการติดเชื้อในวันที่ 10 (4/20) 20 (1/20) และ 30 (2/20) กุ้งกะต๋อม (*M. equidens*) พบการติดเชื้อหลังการกิน 5 วัน (1/17) จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งในสกุล *Macrobrachium* บางชนิด เช่น กุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) นั้นสามารถทนต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ดี ส่วนกุ้งฝอย (*M. lanchesteri*) กุ้งกะต๋อม (*M. sintangense*) และกุ้งกะต๋อม (*M. equidens*) สามารถติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และมีความต้านทานต่อเชื้อได้ดีจึงอาจมีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

สุนิรัตน์ ศรีทามัน (2547 : บทคัดย่อ) จากการทดลองถึงศักยภาพในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ในปูวงศ์ต่างๆ ได้แก่กลุ่มปูแสม วงศ์ Grapsidae 6 ชนิด กลุ่มปูม้า วงศ์ Portunidae 4 ชนิด กลุ่มปูกระดุม วงศ์ Leucosiidae 1 ชนิด กลุ่มปูเสฉวน วงศ์ Pagaridae 1 ชนิด กลุ่มปูก้ามดาบ วงศ์ Ocypodidae 3 ชนิด และกลุ่มปูน้ำจืด วงศ์ Parathelphusidae 1 ชนิด จากบริเวณที่มีการเลี้ยงกุ้ง

กุลาดำในจังหวัดสมุทรปราการโดยการฉีดด้วย haemolymph ของกิ้งกูดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และการตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อใดๆ ตลอดระยะเวลาการทดลอง ซึ่งทำการทดลองยืนยันโดยวิธี RT-PCR แต่พบการติดเชื้อตามธรรมชาติโดยไวรัสอื่นๆ หลายชนิดในด้ปลและด้ปลอ่อน ซึ่งพบในปูแสม 2 ชนิด คือ *Sesarma mederi* และ *S. moeschii* นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในปูวงศ์ Portunidae 2 ชนิด และปูวงศ์ Leucosiidae 1 ชนิด ดังนั้นปูในวงศ์ดังกล่าวน่าจะสามารถทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ดีแต่อาจเป็นพาหะของไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสอื่นๆหลายชนิดที่อาจสามารถถ่ายทอดไปยังกิ้งได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

เก็บรวบรวมสัตว์ชนิดต่างๆ วงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ วงศ์ Agrionidae ได้แก่ ตัวอ่อนแมลงปอเข้ วงศ์ Gammaridae ได้แก่ แอมฟิพอด และวงศ์ Muricidae ได้แก่ หอยมะระ วงศ์ Limulidae ได้แก่ แมงดาหางกลม จากแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอเมืองและอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ วงศ์ Thiaridae มี 2 ชนิด ได้แก่ หอยเจดีย์1 และหอยเจดีย์2 จากอำเภอรังสิตคลอง 8 จังหวัดปทุมธานี

เก็บรวบรวมสัตว์ชนิดต่างๆที่เป็นอาหารสด ในวงศ์ Chironomidae ได้แก่ หนอนแดง วงศ์ Artemiidae ได้แก่ ไรน้ำเค็ม วงศ์ Daphnidae ได้แก่ ไรแดง และวงศ์ Lumbriculidae ได้แก่ ไส้เดือนแดง จากตลาดสวนจตุจักร จังหวัดกรุงเทพฯ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

1. น้ำเค็ม
2. สายยาง
3. หัวทราย
4. เกลือแกง
5. ปั๊มลม (air pump)
6. อาหารเม็ดสำเร็จรูป
7. ชุดกรองน้ำอย่างง่าย
8. ถังพลาสติกขนาดต่างๆ
9. เครื่องวัดความเค็ม (salinometer)
10. เนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

อุปกรณ์สำหรับ immunohistochemistry

1. ปีกเกอร์
2. ถังมือยาง
3. กระบอกตวง
4. กล้องใส่สไลด์
5. ตู้อบ (hot air oven)

6. ชุดเครื่องมือผ่าตัด
7. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. เตาไฟฟ้า (hot plate)
10. ขวดแก้วปากตรง (vial)
11. แท่นอุ่นสไลด์ (slide warmer)
12. ปิเปตพลาสติก (pasture pipette)
13. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (freezer)
14. กล้องพร้อมอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ
15. กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
16. กล้องสเตอริโอ (stereo microscope)
17. ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส (freezer)
18. โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (copling jar)
19. ตู้ดูดควัน (chemical fume hood)
20. ตะกร้าแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (slide basket)
21. ไมโครปิเปตพร้อมทิป (micropipette and tip)
22. สไลด์ (slide) พร้อมกระจกปิดสไลด์ (cover slide)
23. เครื่องปั๊มดูดอากาศ (suction pump) พร้อมอุปกรณ์
24. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome)
25. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยา

อุปกรณ์สำหรับ RT-PCR

1. เครื่องซังสาร
2. เครื่องเขย่าผสมสาร shaker
3. เครื่อง microwave oven (Turbora)
4. หลอด thin wall สำหรับเครื่อง PCR
5. หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. เครื่อง ultraviolet transilluminator (Spectroline)
7. เครื่อง electrophoresis apparatus พร้อมอุปกรณ์
8. เครื่อง thermal cycler (Eppendorf)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)
10. กล้อง polaroid (Gelcam) พร้อมฟิล์ม
11. โกร่งเคลือบสำหรับบดเนื้อเยื่อผ่านการฆ่าเชื้อ



สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1. น้ำกลั่น
2. ไซลีน (xylene)
3. พาราพลาสต์ (paraplast)
4. น้ำยาผนึกสไลด์ (permount)
5. สารละลาย Davidson's fixative
6. นอร์มัลบิวทานอล (N - Butanol)
7. สีฮีมาทอกไซลีน (hematoxylin)
8. สีอีโอซิน 0.02% ในเอทานอล 95 %
9. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl)
10. เอทานอล (ethanol) 70%, 80%, 90% และ 95%
11. สารละลาย P₁⁺ (10 % calf bovine serum ใน PBS)
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH)
13. สารละลายเคลือบสไลด์ (gelatin coat slide solution)
14. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide ,H₂O₂) 30 %
15. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) 0.15 M
pH 7.2
16. ไดอะมีโนเบนซิไดน์เตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)

18. แอนติบอดีสำหรับตรวจเชื้อไวรัสหัดเหลือง

18.1 แอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (first antibody) ได้แก่

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein gp64 ของไวรัสหัดเหลือง (Sithigorngul, et al. 2002 : 71)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ซึ่งจำเพาะต่อ capsid protein p20 ของไวรัสหัดเหลือง (Sithigorngul, et al. 2002 : 71)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein gp116 ของไวรัสหัดเหลือง (Sithigorngul, et al. 2000 : 1)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y3-8H ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein gp116 ของไวรัสหัดเหลือง (Sithigorngul, et al. 2002 : 71)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสเอชพีวี (Rukpratanporn, et al. 2005 : 85)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ซึ่งจำเพาะต่อ enveloped protein VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (Chaivisuthangkura, et al. 2004 : 359)

18.2 แอนติบอดีตัวที่สอง (second antibody) คือ

Goat antimouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)

สารเคมีสำหรับวิธี RT-PCR

รายการที่ 1-5 นำมาจากชุดทดลอง high pure viral nucleic acid kit

Cat no.1858874 ของบริษัท Roche Molecular Biochemicals

1. Proteinase K
2. Elution buffer
3. Washing buffer
4. Working solution
5. Inhibitor removal buffer

รายการที่ 6-7 นำมาจากชุดทดลอง บริษัท Invitrogen

6. 2 x RT - Buffer
7. เอนไซม์ RT/Taq polymerase
8. Primer 10F และ primer 144R
9. Lysis buffer
10. TBE buffer
11. เจล Agarose (Gibco)
12. Blue/Orange 6x Loading dye (Promega)
13. DNA marker
14. Ethidium bromide (Bio-Rad)
15. Isopropanol

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงสัตว์ทดลอง
2. การพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์
3. การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง
4. วิธีทดลอง

5. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการตรวจการติดเชื้อไวรัส

5.1 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี one step RT-PCR

5.2 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี immunohistochemistry

1. การเก็บตัวอย่างและการเลี้ยงสัตว์

1.1 เก็บตัวอย่างสัตว์ชนิดต่างๆ จากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทำการแยกชนิด และนำมาเลี้ยงไว้ในถังพลาสติกขนาด 40 x 49 x 31 เซนติเมตร ทั้งหมดเลี้ยงในอุณหภูมิห้องและแสงธรรมชาติ เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็มเท่ากับแหล่งที่นำมาจากธรรมชาติ

1.2 เก็บตัวอย่างสัตว์ชนิดต่างๆซึ่งเป็นอาหารสด จากสวนจตุจักร ทำการแยกชนิด และนำมาเลี้ยงไว้ในถังพลาสติกขนาด 40 x 49 x 31 เซนติเมตร โดยเลี้ยงในน้ำจืดที่อุณหภูมิห้องและแสงธรรมชาติ ส่วนไร่น้ำเค็มเลี้ยงในน้ำเค็ม 25-30 ppt.

2. การพิสูจน์ทราบชนิด

นำสัตว์แต่ละชนิดมาถ่ายรูปไว้เพื่อที่จะได้บันทึกสีตามธรรมชาติของสัตว์ชนิดต่างๆ เขียนรายละเอียดสถานที่และวันที่เก็บ และจดด้วยสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 % เก็บไว้เพื่อนำไปเปรียบเทียบลักษณะตามอนุกรมวิธาน

3. การเตรียมเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ดุกฮีมอลิมพ์ (haemolymph) จากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองอย่างรุนแรง นำมาปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนของเม็ดเลือด (haemocyte) ออกไป นำส่วนของฮีมอลิมพ์ที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำไปเจือจางด้วยสารละลาย 2X PBS 1:500

4. วิธีทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 วิธี ได้แก่

4.1 การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ

สุ่มตัวอย่างสัตว์ชนิดต่างๆ จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เพื่อทำการตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ติดมาตามธรรมชาติ

4.2 การทดลองการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของสัตว์โดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

สุ่มตัวอย่างสัตว์ชนิดต่างๆ ที่เก็บมาจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง แล้วนำมาเลี้ยงด้วยเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 3 5 10 และ 30 เพื่อนำไปตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

4.3 การทดลองการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

สุ่มตัวอย่างสัตว์ชนิดต่างๆ ที่เก็บตัวมาจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง นำมาฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่เจือจางในสารละลาย 2X PBS 1:500 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปเลี้ยงโดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 3 และ 10 เพื่อนำไปตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

5. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการตรวจการติดเชื้อไวรัส

นำสัตว์ทดลองมาล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วสลบในน้ำเย็นจัด ตัดส่วนของระยางค์และเปลือกหุ้มออก เลือกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อและส่วนที่มีอวัยวะภายในตัดแบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆกันตามความยาวของลำตัว ส่วนหนึ่งใส่ในหลอดที่มี lysis buffer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดลองตามข้อ 5.1 อีกส่วนหนึ่งแช่ในหลอดที่มี Davidson's fixative อย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดลองตามข้อ 5.2

ส่วนสัตว์ทดลองที่มีขนาดเล็ก ได้แก่ ไรแดง กุ้งกะปิ หนอนแดง เป็นต้น นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วสลบในน้ำเย็นจัด นับจำนวนหรือปริมาณให้เท่ากัน แล้วแบ่งใส่ในหลอดที่มี lysis buffer และสารละลาย Davidson's fixative

5.1 การตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี RT – PCR

5.1.1 ขั้นตอนการสกัด RNA จากสัตว์ทดลอง

5.1.1.1 นำเนื้อเยื่อสัตว์แต่ละชนิดมาบดใน lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM EDTA, 50mM NaCl, 2% SDS) ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ด้วยโกร่งเคลื่อนที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บดให้ละเอียดแล้วเทใส่ในหลอด ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงดูด supernatant จากแต่ละหลอดปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ผสมกับ working solution ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ proteinase K ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.1.1.2 เติมน้ำ isopropanol ปริมาณ 100 ไมโครลิตร

5.1.1.3 ประกอบหลอด high pure spin filter และ หลอด high pure collection เข้าด้วยกัน จากนั้นเติมตัวอย่างทั้งหมดที่บ่มแล้วแยกลงในหลอดด้านบน นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

5.1.1.4 ประกอบหลอด high pure collection ขึ้นใหม่กับหลอด high pure spin filter เข้าด้วยกัน จากนั้นเติมน้ำ inhibitor removal buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร บนส่วนผสม นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

5.1.1.5 ล้างส่วนผสมในหลอด high pure spin filter โดยเติม wash buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวในหลอด high pure collection จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้งหนึ่ง

5.1.1.6 นำหลอด high pure spin filter ที่ได้จากการล้าง 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย wash buffer นำไปปั่นที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วินาที แล้วจึงกำจัดในส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

5.1.1.7 ประกอบหลอด high pure spin filter กับหลอด microcentrifuge เข้าด้วยกัน จากนั้นเติม elution buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

5.1.1.8 เก็บกรดนิวคลีอิก (RNA) ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ ในการทดลองแต่ละครั้ง จะต้องมีความควบคุม เพื่อตรวจสอบกรณีมีการปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการปฏิบัติ ทั้งตัวควบคุมผลบวก (positive control) ซึ่งในการทดลองนี้ใช้โมลิพิมพ์ของงููกูลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง และตัวควบคุมผลลบ (negative control) ใช้น้ำกลั่น

5.1.2 ขั้นตอนการทำ RT-PCR

5.1.2.1 ผสมสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR รวมทั้ง RNA ที่สกัดได้จากข้อ 5.1.1 จากเนื้อเยื่อสัตว์แล้วแยกชนิด ใส่ลงในหลอด thin wall ขนาดปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดังนี้

2X RT-PCR buffer	25	ไมโครลิตร
Primer 10F	1	ไมโครลิตร (15 pmol)
Primer 144R	1	ไมโครลิตร (15 pmol)
เอนไซม์ RT/Taq polymerase	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	17	ไมโครลิตร
RNA Template (RNA จากเนื้อเยื่อสัตว์)	5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

5.1.2.2 นำหลอด thin wall เข้าเครื่องพีซีอาร์ (thermal cycler) ปรับอุณหภูมิและเวลา ให้ได้ตามตาราง 1

ตาราง 1 แสดงอุณหภูมิ ระยะเวลาและจำนวนรอบ ในแต่ละขั้นตอนของการทำงานของปฏิกิริยา RT-PCR

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที่ : วินาที)	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที่ : วินาที)	อุณหภูมิ (°c)	เวลา (นาที่ : วินาที)	จำนวนรอบ
1	42	15:00					1
2	95	5:00					1
3	4	5:00					1
4	94	00:30	58	00:30	72	00:30	35
5	72	10:00					1
6	4	-					1

จากตาราง 1

ขั้นตอนที่ 1-3 มีผลทำให้ RNA เปลี่ยนไปเป็น cDNA

ขั้นตอนที่ 4 เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา

ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส DNA ถูกทำให้เสียสภาพแล้วแยกออกจากกัน เป็นสายเดี่ยว 2 สาย (denaturation step)

ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส primer ทั้ง 2 สาย จะเข้าไปจับที่ตำแหน่ง เฉพาะของ DNA สายเดี่ยวทั้ง 2 สาย (annealing step)

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เอนไซม์ *Taq polymerase* ทำงานได้ดีโดยจะ เร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 ของ primer ทำให้ DNA เป็นสายยาว เกิดการจำลอง ที่สมบูรณ์ (elongation step)

ขั้นตอนที่ 5 final extension

ขั้นตอนที่ 6 เป็นการเก็บรักษา DNA

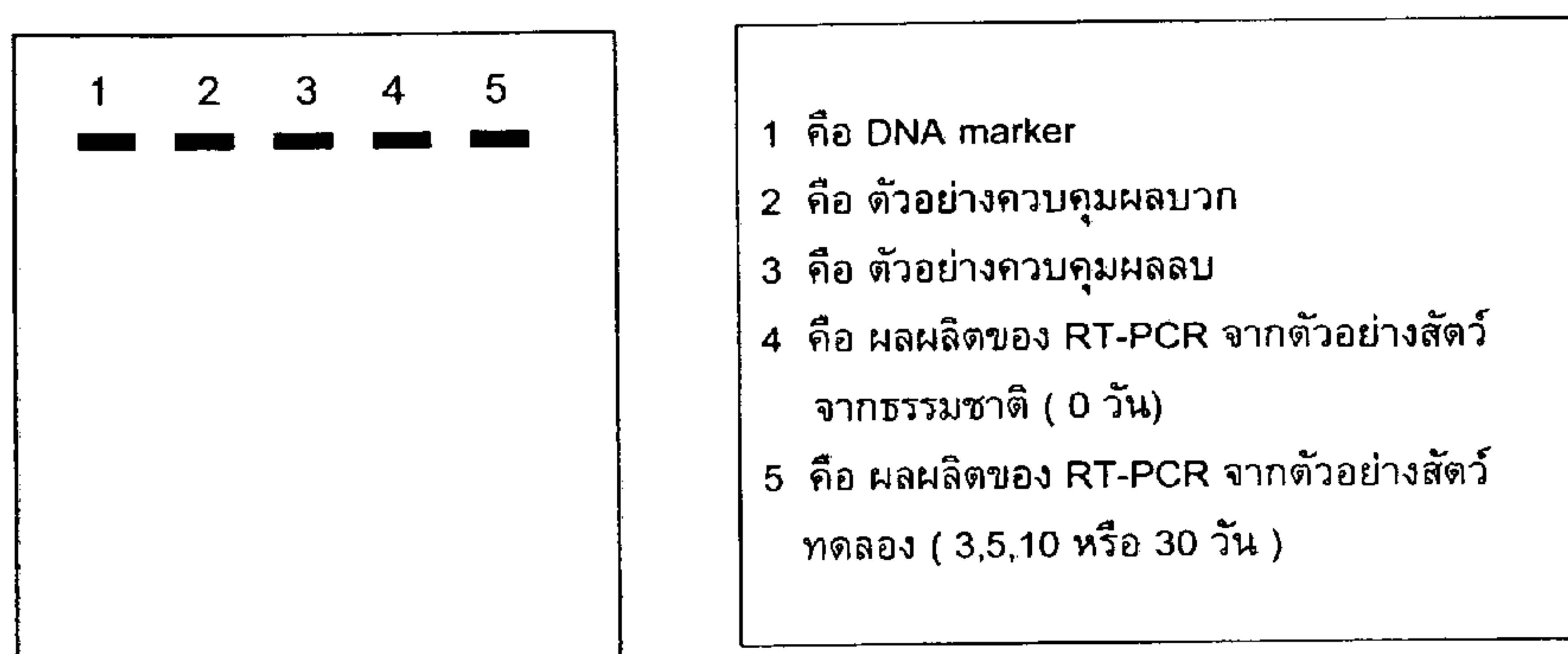
5.1.3 แสดงผลโดยวิธี agarose gel electrophoresis

5.1.3.1 เตรียมเจลที่จะใช้แสดงผลโดยซังผงเจล agarose ปริมาณ 0.6 กรัม ละลายด้วย TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องไมโครเวฟปรับความร้อนปาน กลางนานประมาณ 2 นาที จนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 50 - 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงไปในบล็อกเจลพร้อมเสียบแผ่นหวีพลาสติก (comb) ให้เจลเกิดเป็นร่อง ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

5.1.3.2 นำสี Blue/Orange (6x Loading dye) ที่ได้ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เติมลงในหลอด microcentrifuge เตรียมไว้ให้ครบจำนวนตัวอย่างที่จะหยอดแสดงผลในเจล

5.1.3.3 ดูดตัวอย่างที่ได้หลังจากการทำ one step RT-PCR ซึ่งเป็นผลผลิต PCR (PCR product) จากเนื้อเยื่อสัตว์แต่ละชนิด ตัวควบคุมที่ให้ผลบวกและตัวควบคุมผลลบปริมาณ 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด Blue/Orange (6x Loading dye) ที่เตรียมไว้

5.1.3.4 นำเจลที่แข็งตัวแล้วจัดลงไปเครื่อง eletrophoresis ที่มีสารละลาย TBE buffer รองรับอยู่ในปริมาตรที่พอประมาณท่วมเจล หยอดตัวอย่างลงในไปร่องเจล ซึ่งได้แก่ DNA marker ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก ตัวควบคุมที่ให้ผลลบ และผลผลิตของ RT-PCR จากเนื้อเยื่อสัตว์แต่ละชนิด ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 แสดงตัวอย่างการแสดงผลของ agarose gel electrophoresis RT-PCR

5.1.3.5 เมื่อหยอดตัวอย่างครบแล้ว เปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง หลังจากนั้น ปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้า นำเจลขึ้นย้อมด้วยสี ethidium bromide ประมาณ 10-20 นาที และล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น 20 นาที แล้วจึงนำไปวางบนเครื่อง ultraviolet transilluminator เพื่อดูผลที่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นจึงถ่ายรูปด้วยกล้อง Polaroid

5.2 การตรวจเชื้อไวรัสหัดเหลืองด้วย immunohistochemistry

5.2.1 การเตรียมเนื้อเยื่อทางมิถุนวิทยา

5.2.1.1 นำตัวอย่างสัตว์ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ จากการทดลองให้กินเนื้อกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองและจากการฉีดเชื้อไวรัสหัดเหลืองมาล้างให้สะอาด สลบในน้ำเย็นจัด ตัดระยางค์ส่วนขาและเปลือกออก

5.2.1.2 ตัดเอาเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อและอวัยวะภายในไปทำให้คงรูป (fix) ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.1.3 นำเนื้อเยื่อมาล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.2.1.4 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate) ด้วยเอทานอลเปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กัน และนอร์มัลบิวทานอลตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltrate) ด้วยพาราพลาสติก ดังนี้

- แช่ในเอทานอล 70 %, 90 % ครั้งละ 3 ชั่วโมง
- แช่ในเอทานอล 95 % 2 ครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- แช่ในนอร์มัลบิวทานอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- แช่ในนอร์มัลบิวทานอลที่ผสมกับไซลีน ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา

1 ชั่วโมง

- แช่ในไซลีน 1 ชั่วโมง
- แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสติกหลอมเหลวในอัตราส่วน 1:1 เก็บใน

ตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- แช่ในพาราพลาสติกหลอมเหลว จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที

5.2.1.5 นำเนื้อเยื่อของสัตว์ที่อินฟิลเตรทด้วยพาราพลาสติกแล้วไปฝัง (embed) ในพาราพลาสติกที่อยู่ในบล็อกสีเหลี่ยม

5.2.1.6 ตัดเนื้อเยื่อสัตว์ที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องมือโครโตมแบบโรตารี (rotary microtome) แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน ให้เรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบิ้น (ribbon)

5.2.1.7 นำเซกชัน (section) มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน (gelatin coated) โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ให้เป็นแถว 1 แถวตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชันไปวางบนหยดน้ำ 1 แถว มี 3 เซกชัน ทำ 1 แถวต่อ 1 สไลด์ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยึดไม่มีการซ้อนทับกันของเนื้อเยื่อแล้ว ดูดน้ำออกซับให้แห้ง จะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงบนสไลด์ แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.2 กระบวนการย้อมโดยวิธี indirect peroxidase immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ V3-2B, Y18-2D, Y19 Y3-8H, HPV16-9C และ W29

5.2.2.1 นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราพลาสติกออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffination) โดยวางสไลด์ลงในตะกร้า (slide basket) แล้วจุ่มลงในโถแก้วย้อมเนื้อเยื่อสัตว์ใน

- โซลีนที่ 1 เป็นเวลา 10 นาที
- โซลีนที่ 2, 3 เป็นเวลา 5 นาที

5.2.2.2 เติมน้ำ (hydration) เข้าสู่เนื้อเยื่อสัตว์ด้วยเอทานอล

เปอร์เซ็นต์ต่างๆกันโดยแช่ใน

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

5.2.2.3 ล้างเซกชันด้วยน้ำกลั่นตามด้วยสารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ โดย

- ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที
- แช่ในสารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 10 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

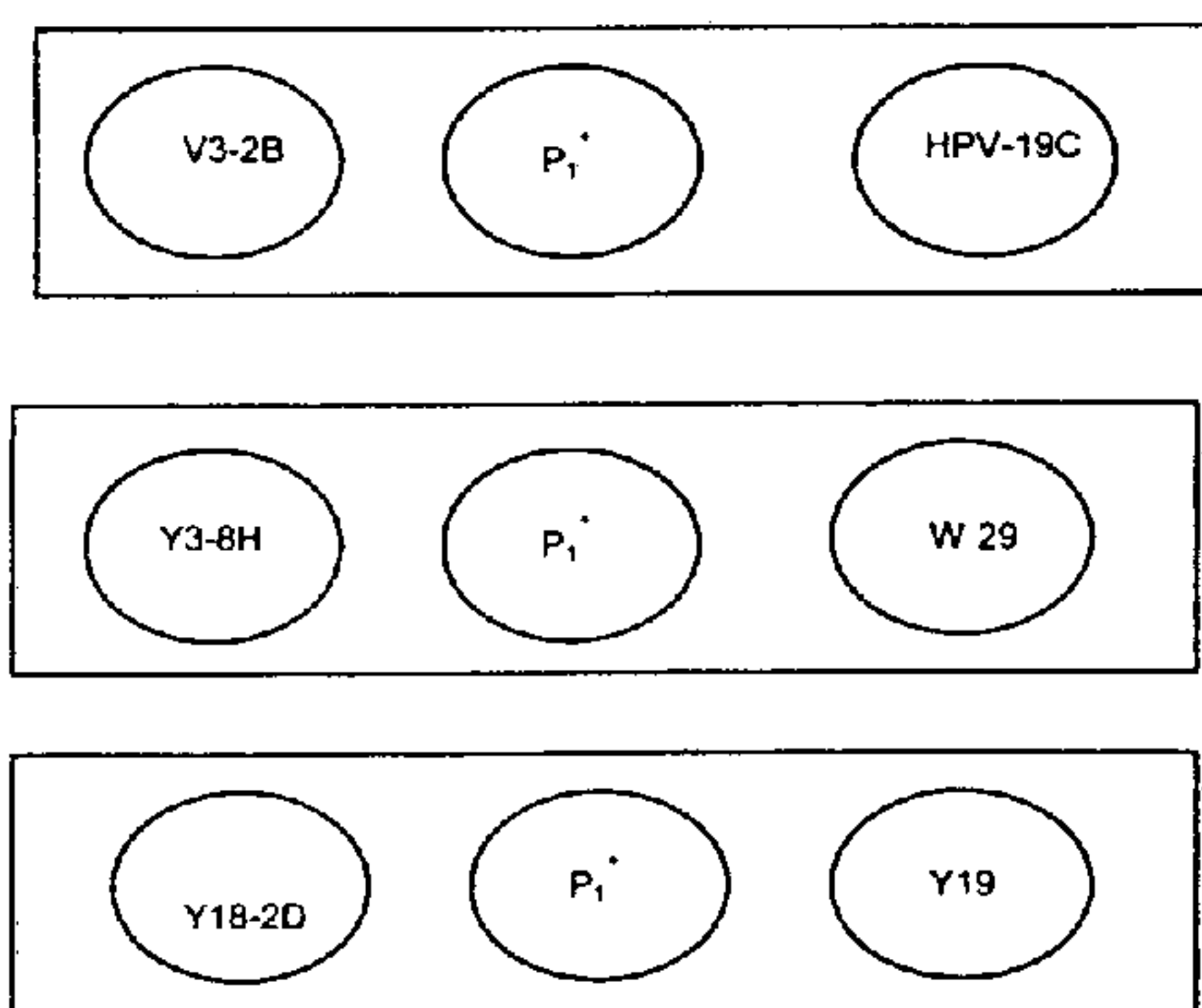
5.2.2.4 การใส่แอนติบอดีตัวที่หนึ่ง

- นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดย

ใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) แล้วหยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเซกชันด้วยไมโครปิเปต นำไปเก็บไว้ในที่ชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

- ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก ยกเว้นเซกชันที่ 2
- หยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ให้คลุมเซกชันที่ 1 และ 3 โดย

แอนติบอดีที่ใช้ คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B, Y3-8H และ Y18-2D ที่เซกชันที่ 1 บนสไลด์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วน HPV16-9C หรือ W29 หรือ Y19 หยดลงที่เซกชันที่ 3 บนสไลด์ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมดเจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 แสดงการหยดแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ในการตรวจหาเชื้อไวรัส

5.2.2.5 การใส่แอนติบอดีตัวที่สอง

- ล้างแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแล้วแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที จากนั้นนำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบๆ ออกจากเนื้อเยื่อ
- หยดแอนติบอดีที่สอง ได้แก่ goat antimouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P₁ ปริมาณ 1:1000 ในทุกเซกชัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- ล้างแอนติบอดีตัวที่สอง ออกจากเซกชันด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแล้วแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที

5.2.2.6 นำเซกชันมาทำปฏิกิริยากับ 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (DAB) 0.03 % และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 % ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 5 นาที

- ล้างเซกชันด้วยน้ำ 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5.2.2.7 ย้อมด้วยสีอีมาทอกไซลีน

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

5.2.2.9 ย้อมทับด้วยสีอีโอซิน 0.02 % ในเอทานอล 95 % ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทานอล 95 %

5.2.2.10 นำเซกชันมาตีสน้ำออกโดยผ่าน

- นอร์มัลบิวทานอลเป็นเวลา 5 นาที
- นอร์มัลบิวทานอลที่ผสมกับไซลีน ในอัตราส่วน 1:1 เวลา 5 นาที
- ไซลีน จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

5.2.2.11 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการผนึกสไลด์ (mount) ด้วยตัวกลางผนึก (permount) จากนั้นจึงนำสไลด์ที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมด้วยกล้องจุลทรรศน์

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. พิสูจน์และจำแนกชนิดตัวอย่างสัตว์ที่เก็บได้
2. ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมตามธรรมชาติ และจากการทดลองการทำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมในสัตว์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี RT-PCR
3. ตรวจหาและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลี่ยมภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อสัตว์ จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D Y19 V3-2B และ Y3-8H

4. ตรวจหาและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อสัตว์ จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C
5. ตรวจหาและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อสัตว์ จากการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29
6. ตรวจหาและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เชื้อไวรัสเอชพีวี และเชื้อไวรัสตัวแดงดวงของอวัยวะต่างๆ ภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อสัตว์ชนิดต่างๆ ในแต่ละวงศ์
7. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อไวรัส
8. บันทึกและนำเสนอข้อมูลด้วยภาพและตาราง

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. การพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์

จากการเก็บรวบรวมสัตว์ในวงศ์ต่างๆ จากแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำและชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมือง อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ และเขตรังสิต คลอง 8 จังหวัดปทุมธานี ได้แก่ กุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) แมงดาหางกลม (*Carcinoscorpius rotundicauda*) แอมฟิพอด (*Gammarus* sp.) ตัวอ่อนแมลงปอเข็ม (*Ischnura* sp.) หอยมะระ (*Thais* sp.) หอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*) และหอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*)

เก็บรวบรวมสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารสดสำหรับใช้เลี้ยงลูกกุ้ง ได้แก่ ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) ไรแดง (*Moina macrocopa*) หนอนแดง (*Chironomus* sp.) และไส้เดือนแดง (*Lumbriculus variegatus*) จากตลาดสวนจตุจักร จังหวัดกรุงเทพฯ

นำมาศึกษาลักษณะต่างๆ โดยนำมาเปรียบเทียบกับวิทยานิพนธ์ของกัลยาณี ยงจินดารัตน์ เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา (2531) หนังสือสังขวิทยาของสุมชาติ อุปถัมภ์และคนอื่นๆ (2538) หนังสือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง แอนเนลิด ถึง โพรโทคอร์ดาตาของบพิธ จารุพันธุ์และนันทพร จารุพันธุ์ (2546) หนังสือบทปฏิบัติการสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เล่ม 2 ของบพิธ จารุพันธุ์ (2529) เว็บไซต์ของกรมประมง และจากการสัมภาษณ์จากผู้เชี่ยวชาญในการจำแนกชนิดของสัตว์เฉพาะทาง ซึ่งสามารถพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ชนิดต่างๆ ได้ดังนี้

สัตว์ในไฟลัม Arthropoda

Class crustacea ได้แก่

- 1.1 สัตว์ในวงศ์ Atyidae ได้แก่ กุ้งกะปิ (*Caridina* sp.)
(ภาพประกอบ 3)
- 1.2 สัตว์ในวงศ์ Artemiidae ได้แก่ ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*)
(ภาพประกอบ 4)
- 1.3 สัตว์ในวงศ์ Daphnidae ได้แก่ ไรแดง (*Moina macrocopa*)
(ภาพประกอบ 5)
- 1.4 สัตว์ในวงศ์ Gammaridae ได้แก่ แอมฟิพอด (*Gammarus* sp.)
(ภาพประกอบ 6)

Class insecta ได้แก่

- 1.5 สัตว์ในวงศ์ Agriomidae ได้แก่ ตัวอ่อนแมลงปอเข็มตัว (*Ischnura* sp.)
(ภาพประกอบ 7)
- 1.6 สัตว์ในวงศ์ Agrionidae ได้แก่ ตัวเต็มวัยแมลงปอเข็มตัว (*Ischnura* sp.)
(ภาพประกอบ 8)
- 1.7 สัตว์ในวงศ์ Chironomidae ได้แก่ หนอนแดง (*Chironomus* sp.)
(ภาพประกอบ 9)

Class merostomata ได้แก่

- 1.8 สัตว์ในวงศ์ Limulidae ได้แก่ แมงดาหางกลม (*Carcinoscorpius rotundicauda*)
(ภาพประกอบ 10)

สัตว์ในไฟลัม Mollusca

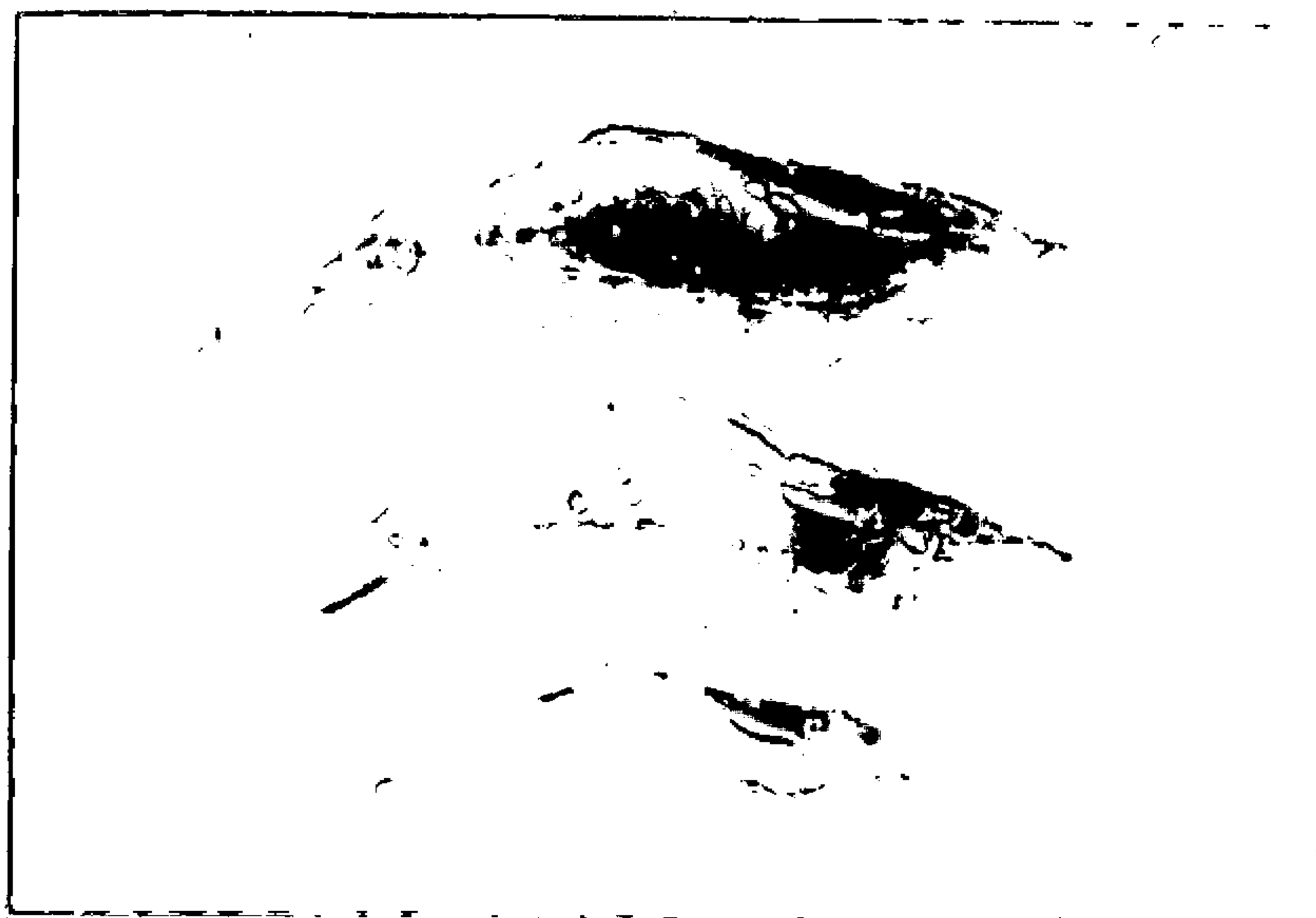
Class gastropoda ได้แก่

- 1.9 สัตว์ในวงศ์ Muricidae ได้แก่ หอยมระ (Thais sp.)
(ภาพประกอบ 11)
- 1.10 สัตว์ในวงศ์ Thiaridae ได้แก่ หอยเจดีย์1 (*Melanoides tuberculata*)
(ภาพประกอบ 12)
- 1.11 สัตว์ในวงศ์ Thiaridae ได้แก่ หอยเจดีย์2 (*Sermyla riqueti*)
(ภาพประกอบ 13)

สัตว์ในไฟลัม Annelida

Class oligochaeta ได้แก่

- 1.12 สัตว์ในวงศ์ Lumbriculidae ได้แก่ ไส้เดือนแดง (*Lumbriculus variegatus*)
(ภาพประกอบ 14)



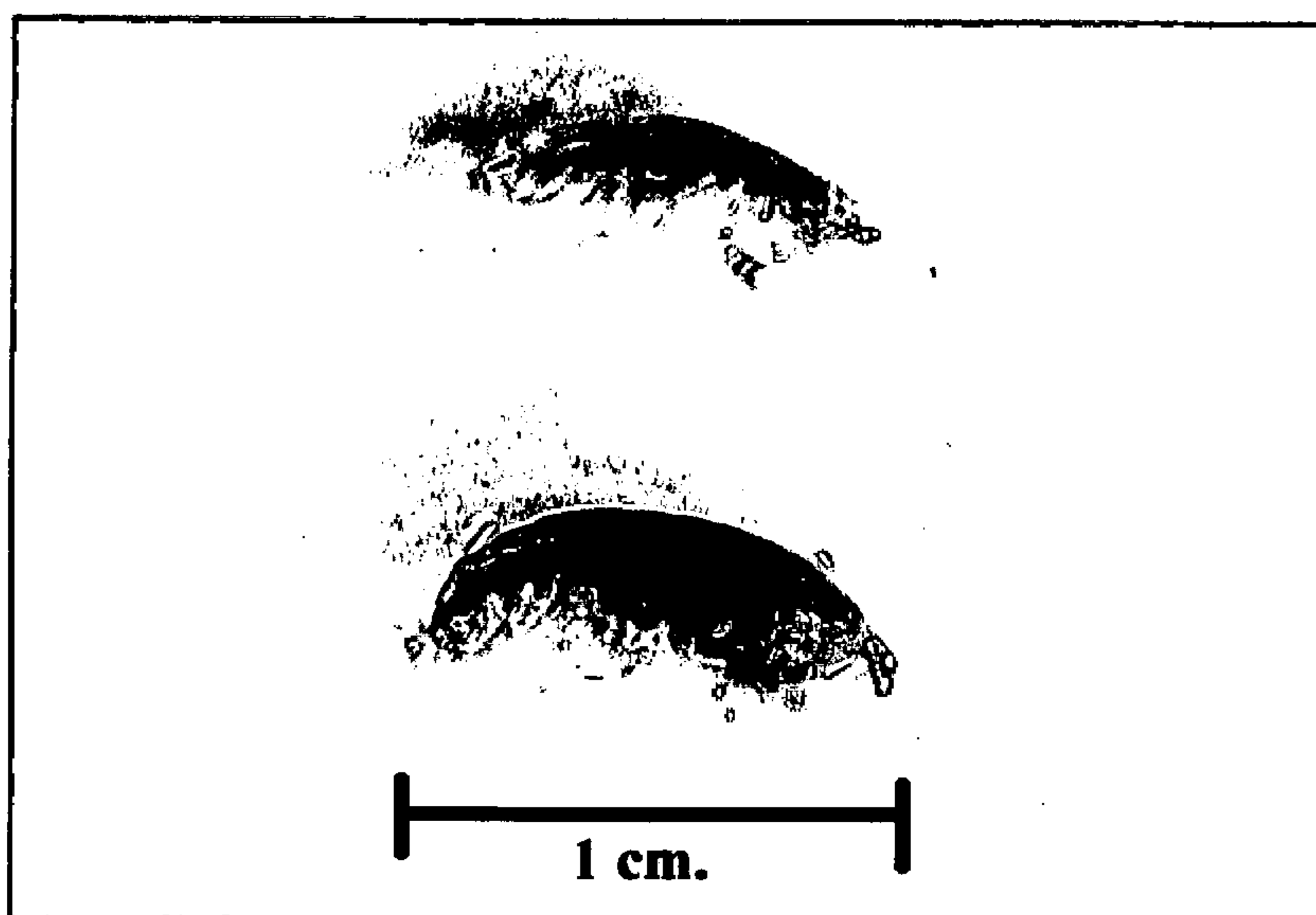
ภาพประกอบ 3 ลักษณะของกุ้งกะปิ (*Caridina* sp.)



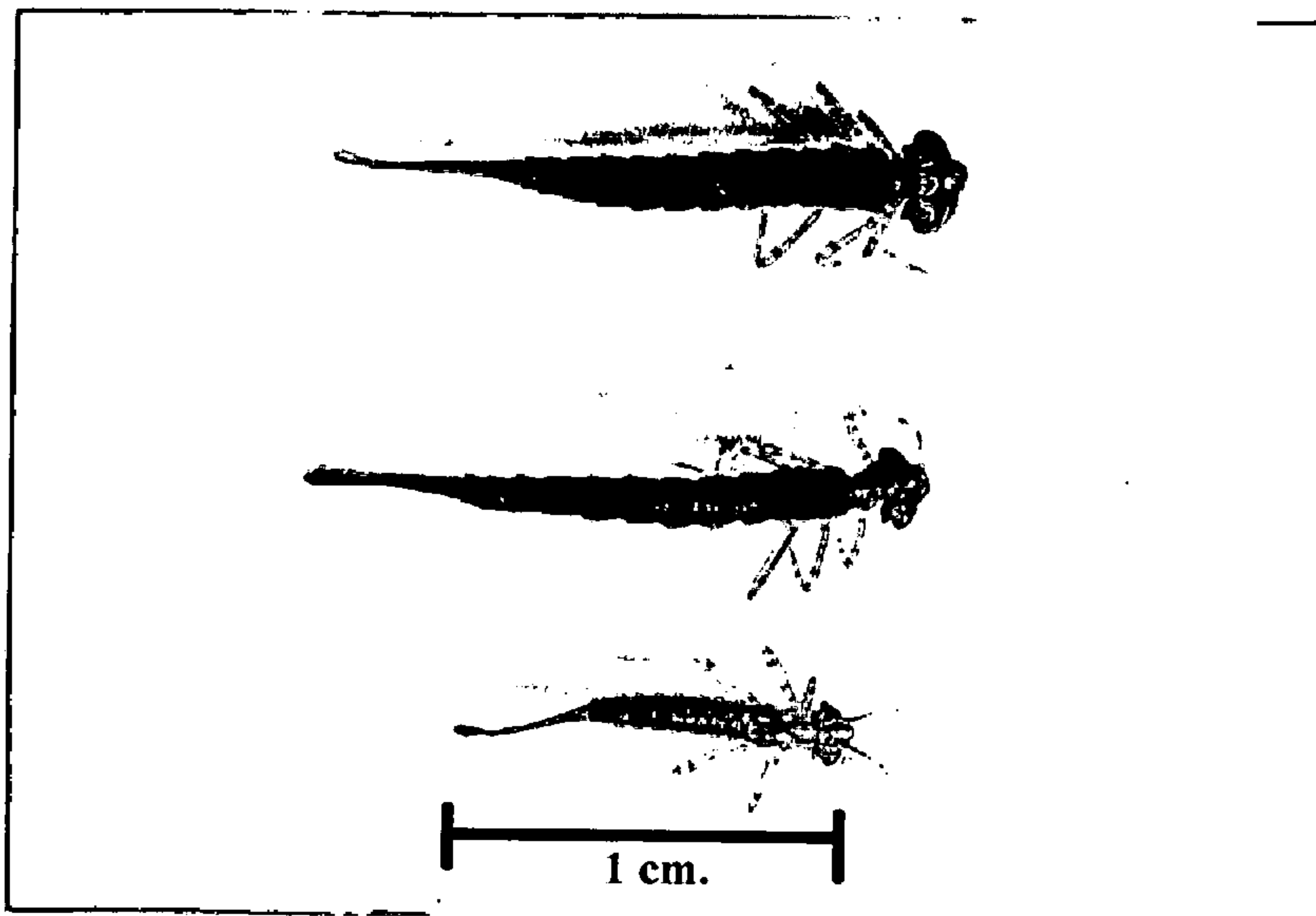
ภาพประกอบ 4 ลักษณะของไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*)



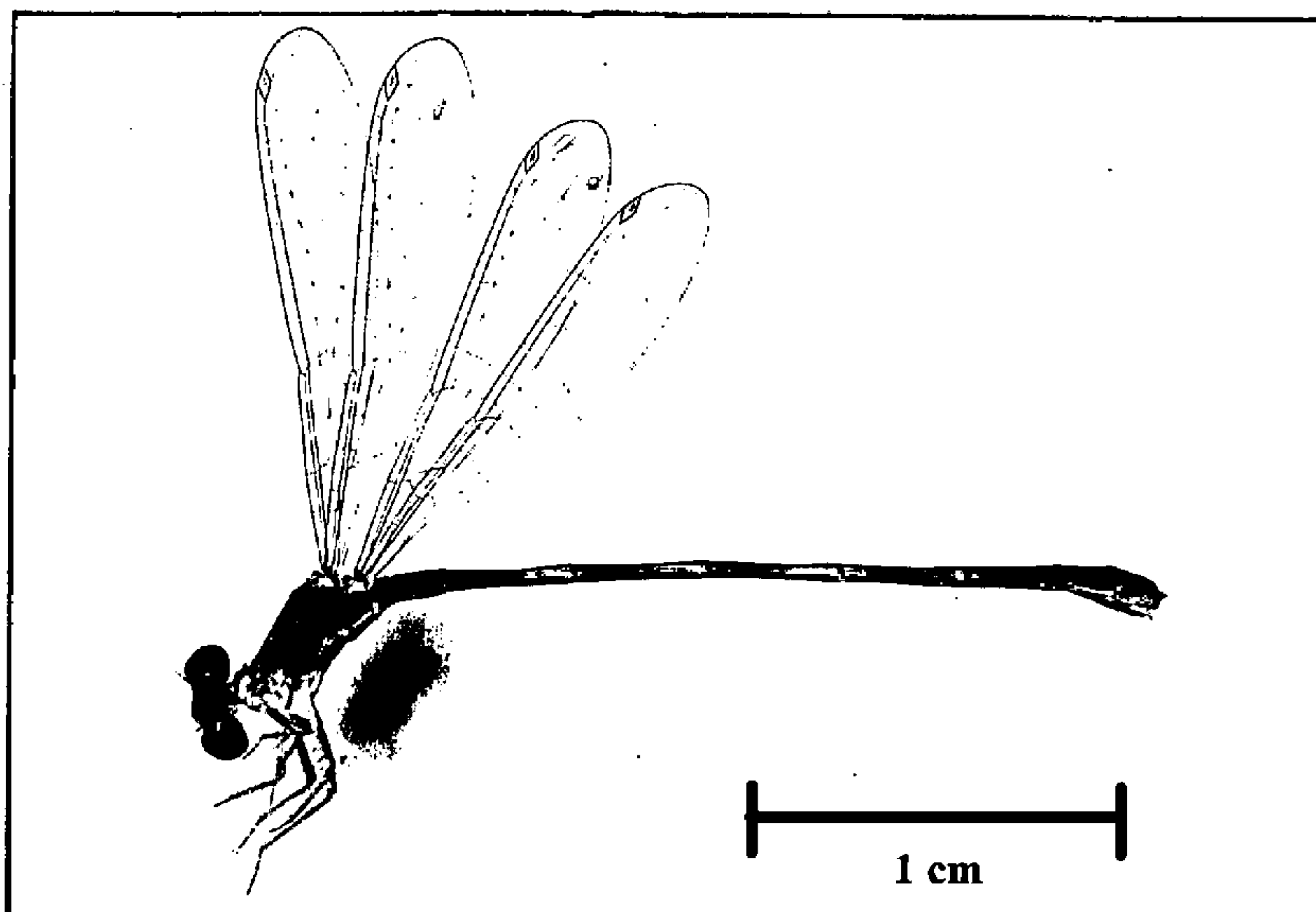
ภาพประกอบ 5 ลักษณะของไรแดง (*Moina macrocopa*)



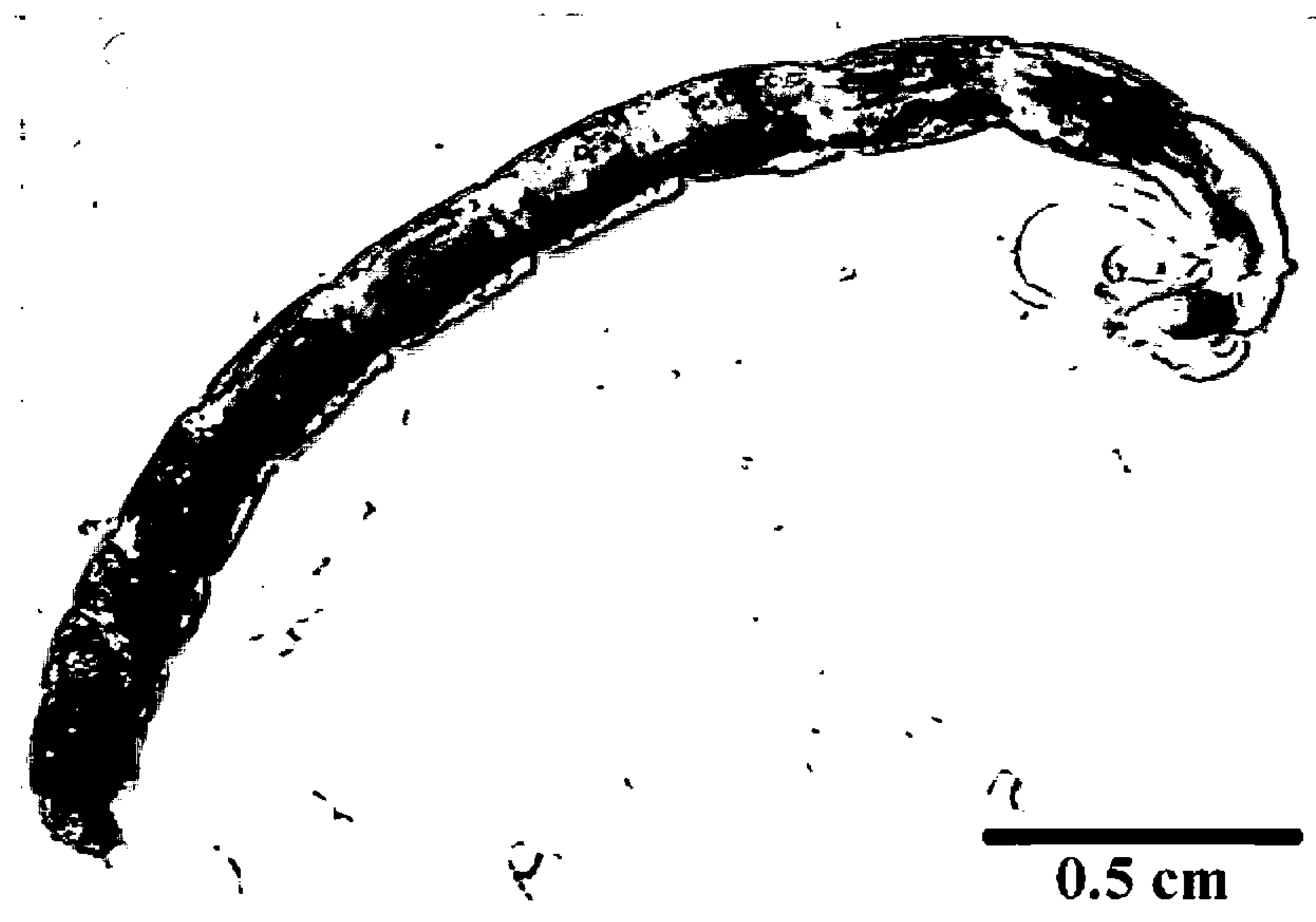
ภาพประกอบ 6 ลักษณะของแอมฟิพอด (*Gammarus* sp.)



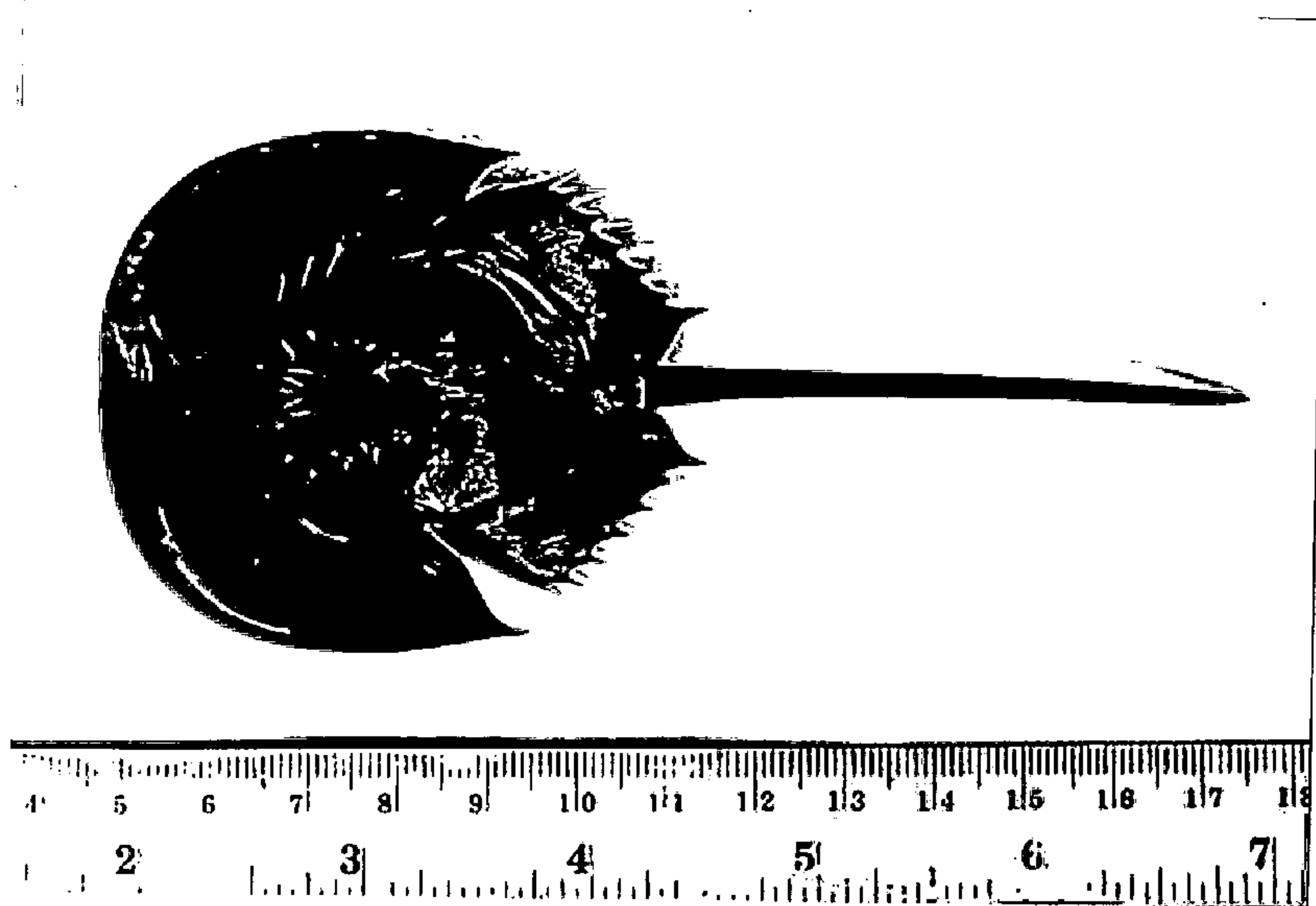
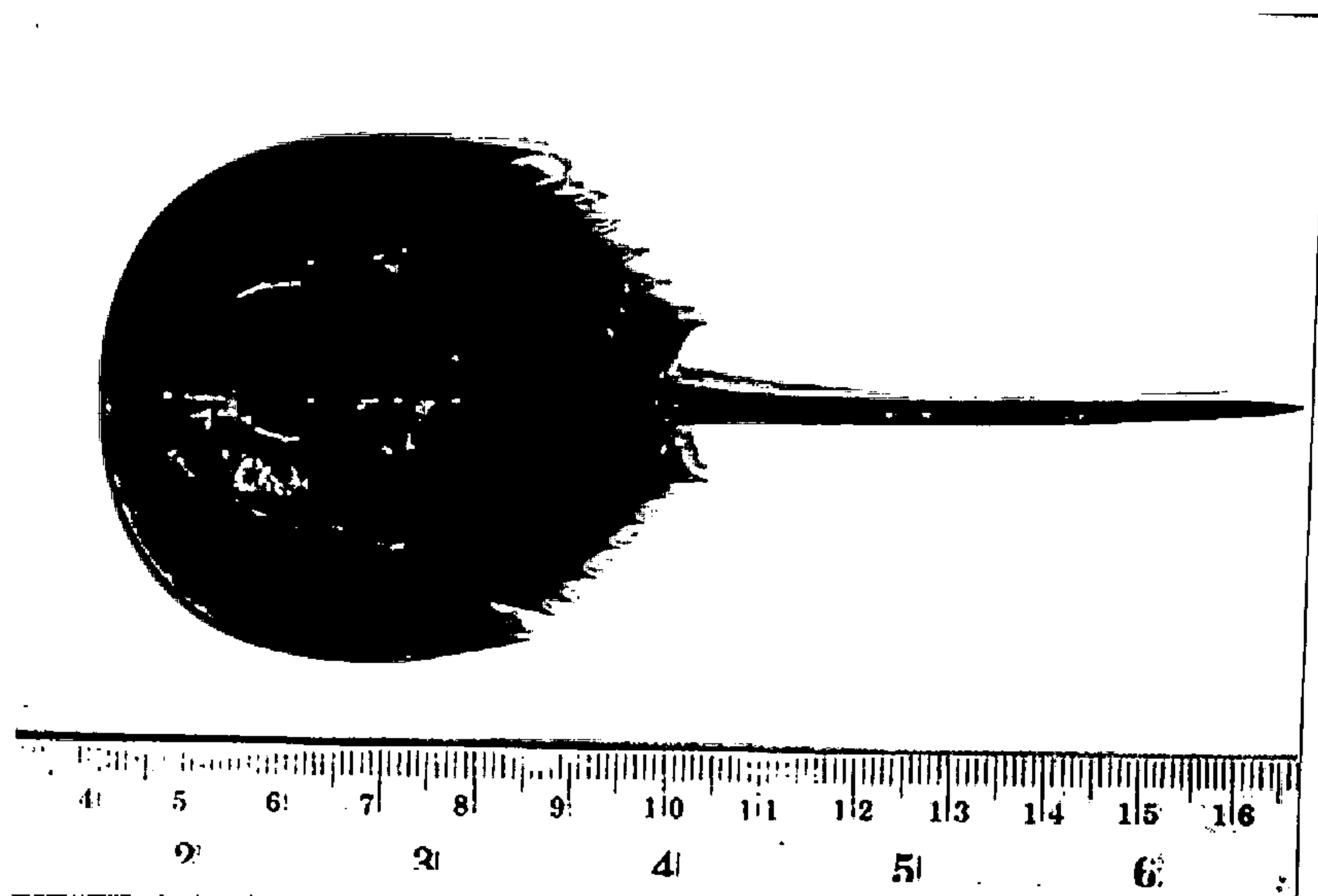
ภาพประกอบ 7 ลักษณะของตัวอ่อนแมลงปอเข็ม (*Ischnura* sp.)



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของตัวเต็มวัยแมลงปอเข็ม (*Ischnura* sp.)



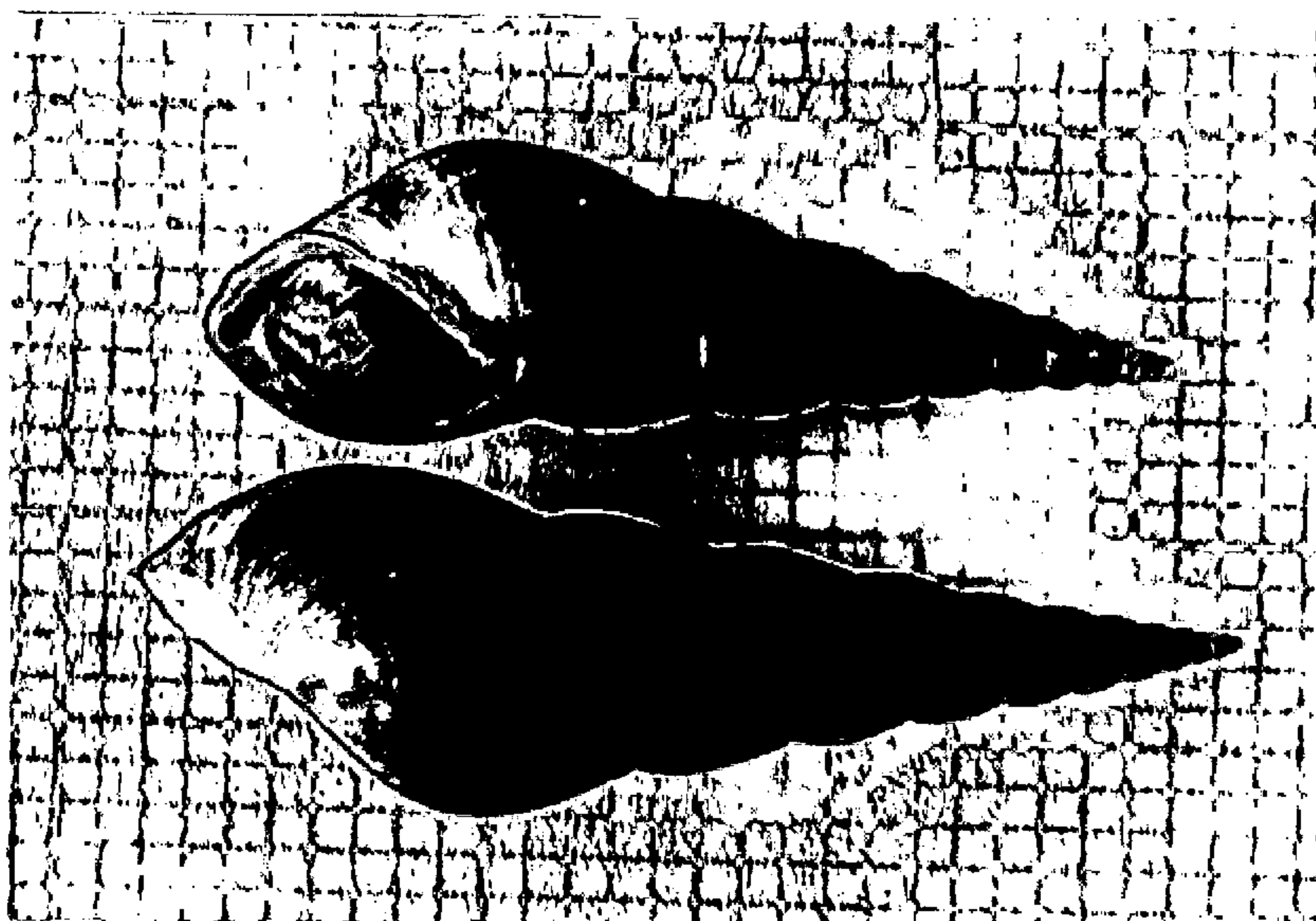
ภาพประกอบ 9 ลักษณะของหนอนแดง (*Chironomus* sp.)



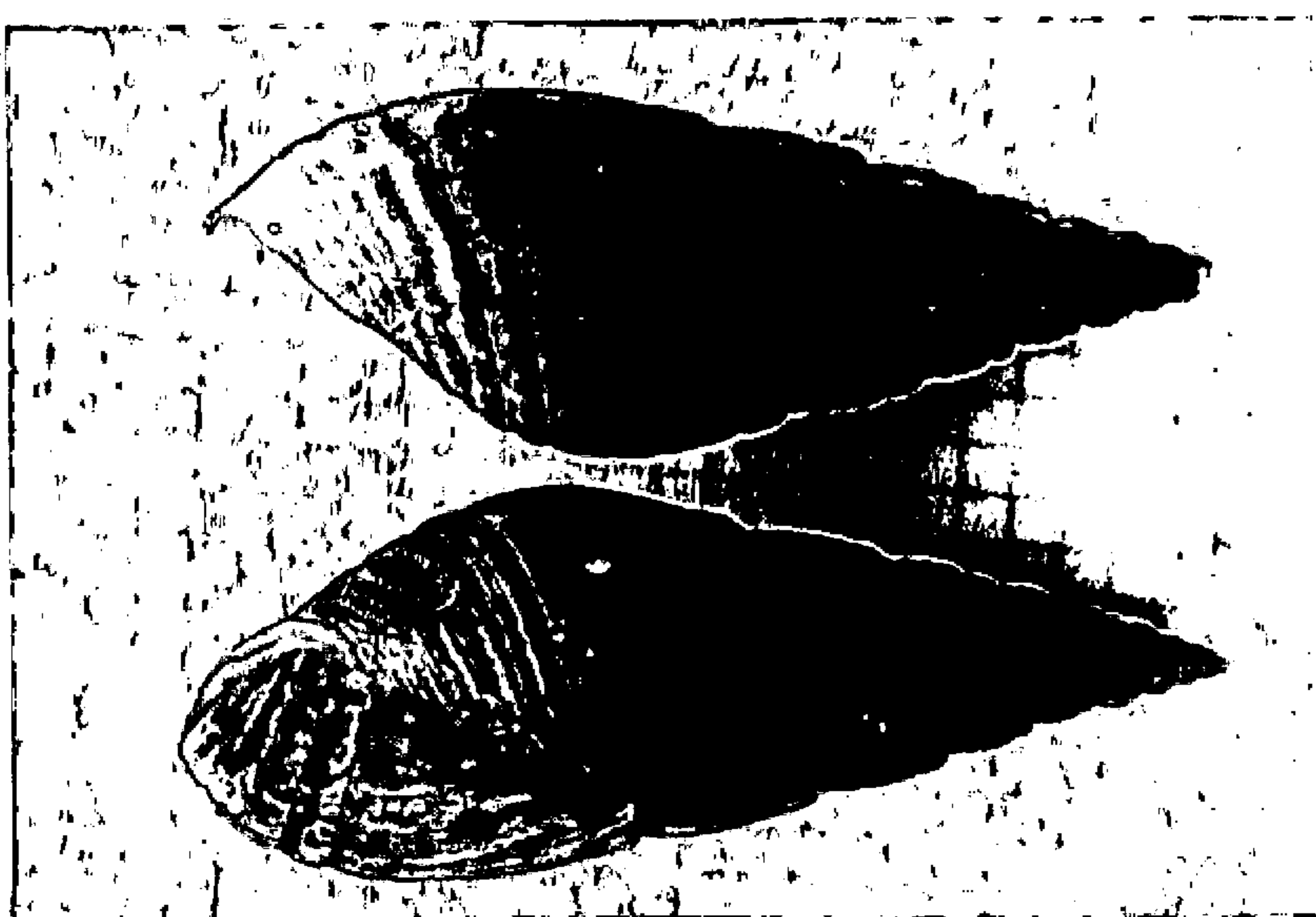
ภาพประกอบ 10 ลักษณะของแมงดาทะเล (*Carcinoscorpius rotundicauda*)



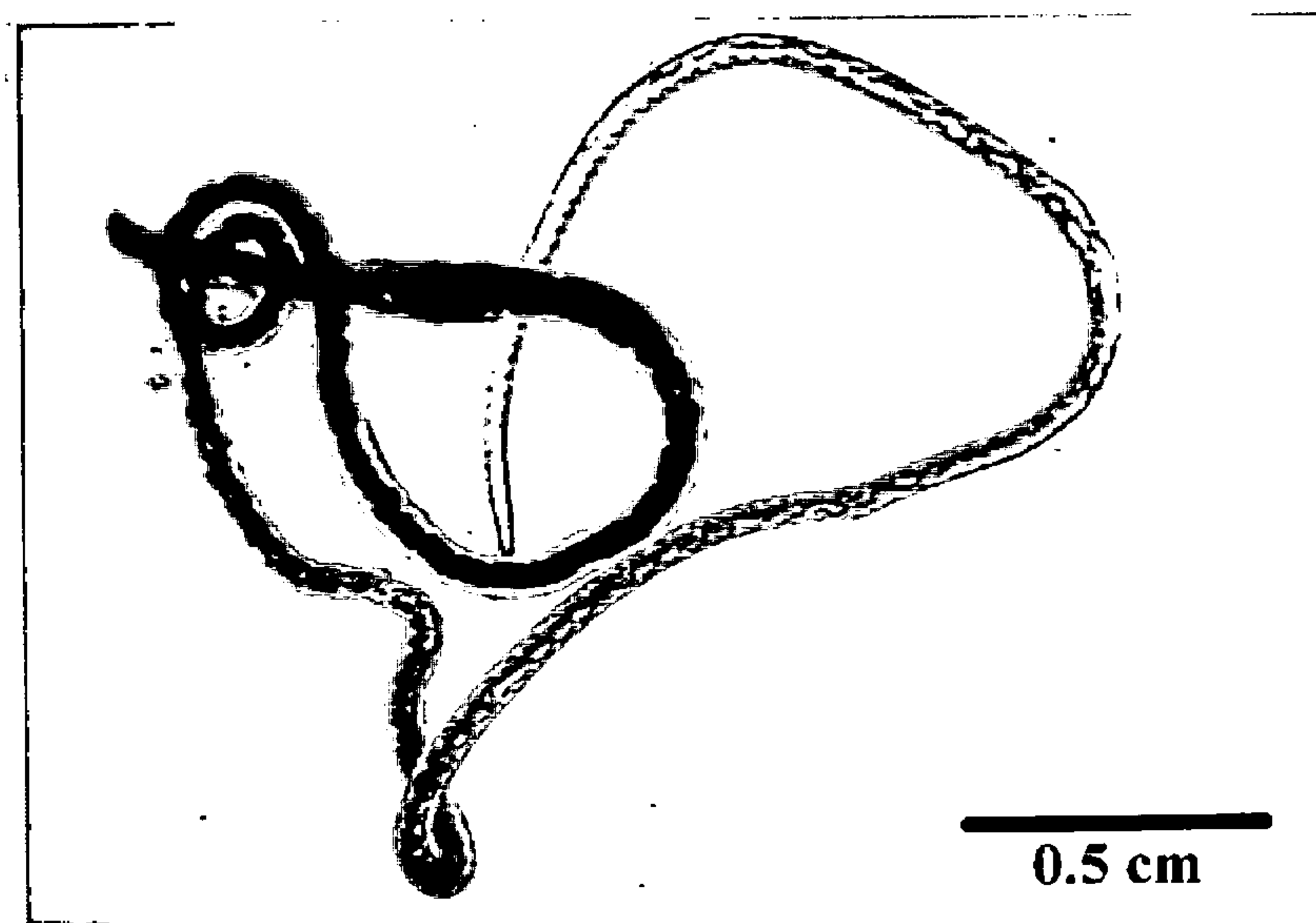
ภาพประกอบ 11 ลักษณะของหอยมะระ (*Thais* sp.)



ภาพประกอบ 12 ลักษณะของหอยเจดีย์1 (*Melanoides tuberculata*)



ภาพประกอบ 13 ลักษณะของหอยเจดีย์2 (*Sermyla riqueti*)



ภาพประกอบ 14 ลักษณะของ ไส้เดือนแดง (*Lumbriculus variegatus*)

2. การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากสัตว์ 3 ไฟล์ม ที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติ ทั้งหมดจำนวน 11 ชนิด ประกอบด้วย ไฟล์ม Arthropoda 3 class ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย (Crustacea) 4 ชนิด ได้แก่ กุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) วงศ์ Atyidae แอมฟิพอด (*Gammarus* sp.) วงศ์ Gammaridae ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) วงศ์ Artemiidae ไรแดง (*Moina macrocopa*) วงศ์ Daphnidae สัตว์ในกลุ่มแมลง (Insecta) 2 ชนิด ได้แก่ หนอนแดง (*Chironomus* sp.) วงศ์ Chironomidae และตัวอ่อนแมลงปอเข็ม (*Ischnura* sp.) วงศ์ Agrionidae สัตว์ในกลุ่มแมงดาทะเล (Merostomata) 1 ชนิด ได้แก่ แมงดาหางกลม (*Carcinoscorpius rotundicauda*) วงศ์ Limulidae ไฟล์ม Annelida 1 class ได้แก่ กลุ่มไส้เดือน (Oligochaeta) 1 ชนิด ได้แก่ ไส้เดือนแดง (*Lumbriculus variegatus*) วงศ์ Lumbriculidae ไฟล์ม Mollusca 1 class ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มหอยฝาเดียว (Gastropoda) 3 ชนิด ได้แก่ หอยมะระ (*Thais* sp.) วงศ์ Muricidae และหอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*) และหอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*) วงศ์ Thiaridae โดยสัตว์ที่มีตัวขนาดเล็กทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ส่วนที่มีตัวขนาดใหญ่ทดลองโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แล้วเมื่อนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากสัตว์ที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติ (0 วัน) จากการทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (3 5 10 และ 30 วัน) โดยวิธี RT-PCR ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในสัตว์วงศ์ต่างๆดังกล่าว ซึ่งผลได้จากเทคนิค RT-PCR ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี gel agarose eletrophoresis (ตาราง 2-3 และ ภาพประกอบ 15-16)

ตาราง 2 แสดงชนิดสัตว์ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ และนำมาชักนำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ

วงศ์และ species	วิธีการ ตรวจ YHV	Natural infection 0 วัน	การตรวจเชื้อหลังได้รับ เชื้อ YHV (วัน)				หมายเหตุ	แหล่งที่เก็บและ ความเค็มของน้ำ (ppt)
			3	5	10	30		
Atyidae กุ้งกะปิ (<i>Caridina</i> sp.)	RT-PCR IHC	-(30) -(30)		-(30) -(30)	-(30) -(30)	*(30) -(30)		ด.บางปลากรด อ.พระสมุทรเจดีย์ 5 ppt.
Artemiidae ไรน้ำเค็ม (<i>Artemia salina</i>)	RT-PCR IHC	-(~500) -(~500)		-(~500) -(~500)	-(~500) -(~500)			ตลาดสวนจตุจักร 20-30 ppt.
Daphnidae ไรแดง (<i>Moina macrocopa</i>)	RT-PCR IHC	-(~450) -(~450)		-(~450) -(~450)				ตลาดสวนจตุจักร น้ำจืด
Gammaridae แอมฟิพอด (<i>Gammarus</i> sp.)	RT-PCR IHC	-(20) -(20)	-(10) -(10)	-(16) -(16)				ด.บางปลากรด อ.พระสมุทรเจดีย์ 5 ppt.
Chironomidae หนอนแดง (<i>Chironomus</i> sp.)	RT-PCR IHC	-(~200) -(~200)	-(~40) -(~40)					ตลาด สวนจตุจักร น้ำจืด
Agriomidae ตัวอ่อนแมลงปอเข็ม (<i>Ischnura</i> sp.)	RT-PCR IHC	-(20) *		-(10) -(10)	-(7) -(8)			ด.บางปลากรด อ.พระสมุทรเจดีย์ 5 ppt.

* ไม่ได้ตรวจสอบ

- ไม่พบการติดเชื้อ

ตาราง 2 (ต่อ)

วงศ์และ species	วิธีการ ตรวจ YHV	Natural infection 0 วัน	การตรวจเชื้อหลังได้รับ เชื้อ YHV (วัน)				หมายเหตุ	แหล่งที่เก็บและ ความเค็มของน้ำ (ppt.)
			3	5	10	30		
Thiaridae หอยเจดีย์ 1 (<i>Melanoides tuberculata</i>)	RT-PCR IHC RT-PCR IHC	-(30) -(30) -(30) -(30)		-(30) -(30) -(30) -(30)	-(30) -(30) -(30) -(30)	*(30) -(30) -(30) -(30)	พบตำแหน่งที่ติดสี น้ำตาลในเนื้อเยื่อ แต่ไม่ใช่ไวรัสซึ่ง เกิดจากการจับ อย่างไม่จำเพาะ ของแอนติบอดี	รังสิต คลอง 8 จ. ปทุมธานี 0-5 ppt.
Thiaridae หอยเจดีย์ 2 (<i>Sermyla riqueti</i>)	RT-PCR IHC RT-PCR IHC RT-PCR IHC	-(30) -(30) -(10) -(10) -(30) -(30)		 -(10) -(10) -(30) -(30)	-(30) -(30) -(30) -(30)		พบตำแหน่งที่ติดสี น้ำตาลในเนื้อเยื่อ แต่ไม่ใช่ไวรัสซึ่ง เกิดจากการจับ อย่างไม่จำเพาะ ของแอนติบอดี	รังสิต คลอง 8 จ. ปทุมธานี 0-5 ppt.
Lumbriculidae ไส้เดือนแดง (<i>Lumbriculus variegatus</i>)	RT-PCR IHC	-(~400) -(~400)		-(~400) -(~400)	-(~400) -(~400)			ตลาดสวนจตุจักร น้ำจืด

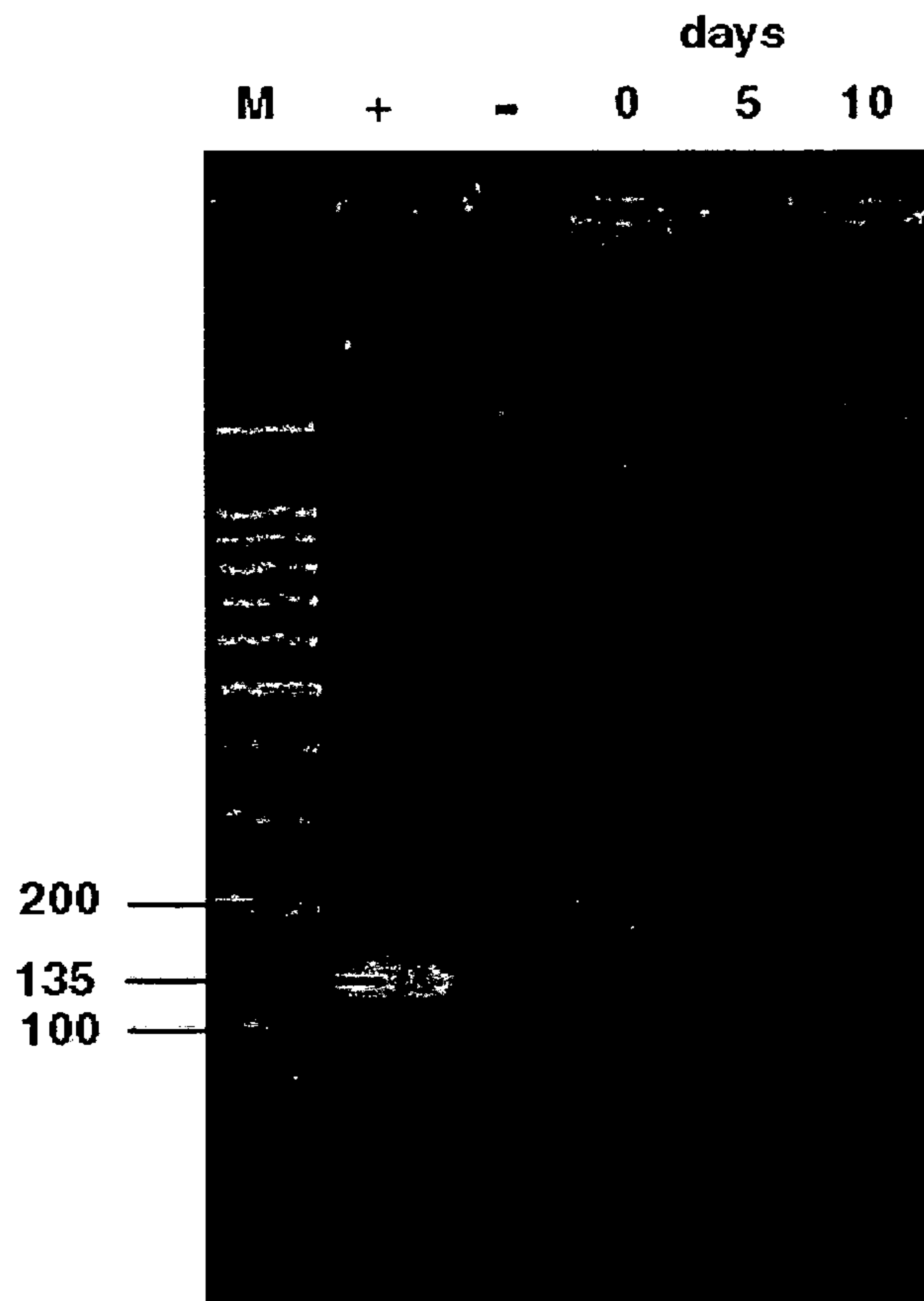
* ไม่ได้ตรวจสอบ
- ไม่พบการติดเชื้อ

ตาราง 3 แสดงชนิดสัตว์ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ และนำมาชักนำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการฉีด แล้วเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบที่ระยะเวลาต่าง ๆ

วงศ์และ species	วิธีการ ตรวจ YHV	Natural infection 0 วัน	การตรวจเชื้อหลังได้รับ เชื้อ YHV (วัน)			หมายเหตุ	แหล่งที่เก็บและ ความเต็มของน้ำ (ppt)
			3	10	30		
Limulidae แมงดาหางกลม (<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>)	RT-PCR IHC	-(16) -(16)	-(15) -(15)	-(20) -(20)			ต. บางปูใหม่ อ.เมือง จ. สมุทรปราการ 5 ppt.
Muricidae หอยมะระ (<i>Thais</i> sp.)	RT-PCR IHC RT-PCR IHC	 -(20) -(20)	*(10) -(10) -(20) -(20)	*(5) -(5) -(26) -(26)		พบตำแหน่งที่ติดสี น้ำตาลในเนื้อเยื่อ แต่ไม่ใช่ไวรัส ซึ่ง เกิดจากการจับ อย่างไม่จำเพาะ ของแอนติบอดี	ต. บางปูใหม่ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 5 ppt.

* ไม่ได้ตรวจสอบ

- ไม่พบการติดเชื้อ

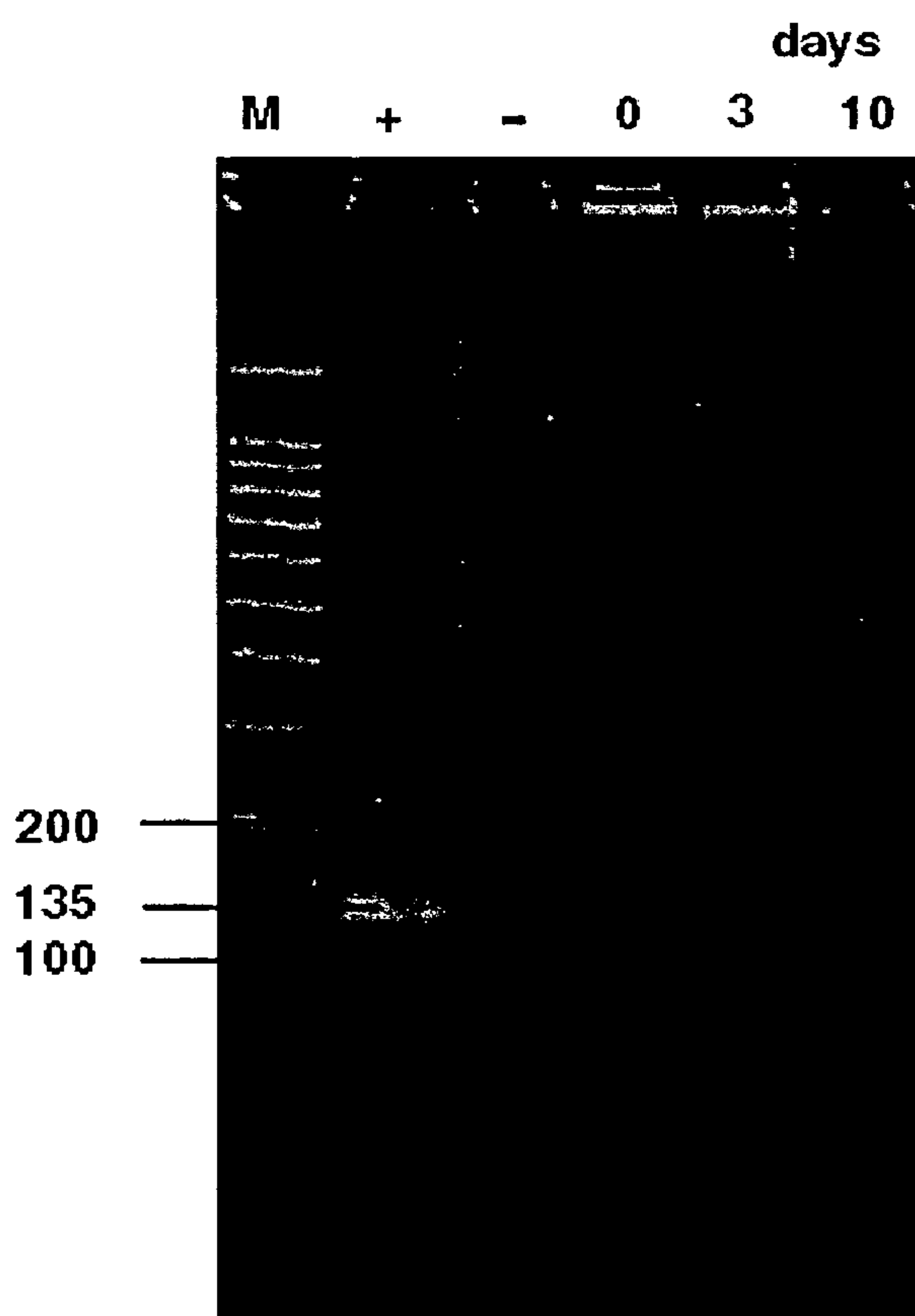


ภาพประกอบ 15 แสดงผลจาก RT-PCR ของกุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) ที่รวบรวมจากธรรมชาติ (0 วัน) และการให้กินเนื้อกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลือง ที่ระยะเวลา 5 และ 10 วัน ตามลำดับ ซึ่งไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

M = DNA marker

+ = positive control

- = negative control



ภาพประกอบ 16 แสดงผลจาก RT-PCR ของหอยมะระ (*Thais* sp.) ที่รวบรวมจากธรรมชาติ (0 วัน) และการฉีดไวรัสหัวเหลือง ที่ระยะเวลา 3 และ 10 วัน ตามลำดับ ซึ่งไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

M = DNA marker

+ = positive control

- = negative control

3. การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry

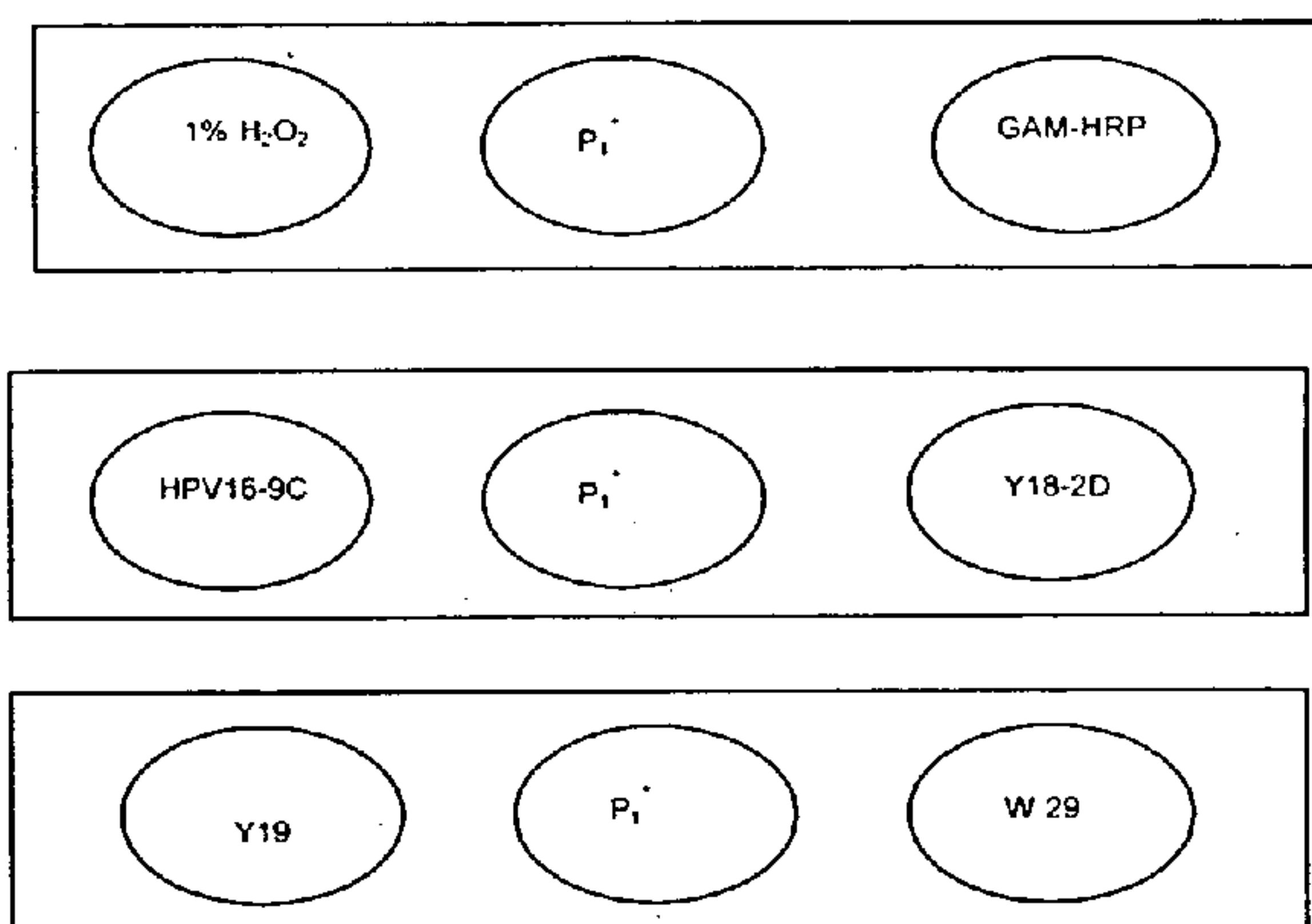
จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากสัตว์ 3 ไฟลัม ที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติทั้งหมดจำนวน 11 ชนิด ประกอบด้วย ไฟลัม Arthropoda 3 class ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชีย (Crustacea) 4 ชนิด ได้แก่ กุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) วงศ์ Atyidae แอมฟิพอด (*Gammarus* sp.) วงศ์ Gammaridae ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) วงศ์ Artemiidae ไรแดง (*Moina macrocopa*) วงศ์ Daphnidae สัตว์ในกลุ่มแมลง (Insecta) 2 ชนิด ได้แก่ หนอนแดง (*Chironomus* sp.) วงศ์ Chironomidae และตัวอ่อนแมลงปอเข็ม (*Ischnura* sp.) วงศ์ Agrionidae สัตว์ในกลุ่มแมงดาทะเล (Merostomata) 1 ชนิด ได้แก่ แมงดาหางกลม (*Carcinoscorpius rotundicauda*) วงศ์ Limulidae ไฟลัม Annelida 1 class ได้แก่ กลุ่มไส้เดือน (Oligochaeta) 1 ชนิด ได้แก่ ไส้เดือนแดง (*Lumbriculus variegatus*) วงศ์ Lumbriculidae ไฟลัม Mollusca 1 class ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มหอยฝาเดียว (Gastropoda) 3 ชนิด ได้แก่ หอยมะระ (*Thais* sp.) วงศ์ Muricidae และหอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*) และหอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*) วงศ์ Thiaridae โดยสัตว์ที่มีตัวขนาดเล็กทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ส่วนที่มีตัวขนาดใหญ่ทดลองโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ตาราง 2-3) แล้วเมื่อนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากสัตว์ที่รวบรวมได้ตามธรรมชาติ (0 วัน) จากการทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (3 5 10 และ 30 วัน) โดยวิธี immunohistochemistry ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใดๆ ของสัตว์ทั้ง 10 วงศ์ ดังกล่าว (ภาพประกอบ 23)

แต่ในการทดลองนี้พบการเกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อคล้ายกับการติดไวรัส ซึ่งพบในสัตว์วงศ์ Thiaridae ได้แก่ หอยเจดีย์ 1 และหอยเจดีย์ 2 เมื่อทำการทดลองซ้ำโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 % ($1\% \text{H}_2\text{O}_2$) และ GAM-HRP (1:1000) หยดลงบนเนื้อเยื่อในสไลด์ เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมผลเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาการยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวที่หนึ่งซึ่งจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง ไวรัสเอชพีวี และไวรัสตัวแดงดวงขาว แล้วทำการทดลองตามวิธี immunohistochemistry (ข้อ 5.2.2) จากนั้นนำสไลด์ไปดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ ปรากฏว่า บนเซกชันที่หยดด้วย 1 % H_2O_2 ไม่เกิดตะกอนสีน้ำตาลที่บริเวณเนื้อเยื่อดำแหน่งเดียวกัน แต่เซกชันอื่นเกิดตะกอนสีน้ำตาลที่บริเวณเนื้อเยื่อดำแหน่งเดียวกันทั้งหมด จากผลการทดลองดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าสัตว์วงศ์ Thiaridae ได้แก่ หอยเจดีย์ 1 และหอยเจดีย์ 2 มีเนื้อเยื่อหรืออวัยวะบางกลุ่มที่สามารถหลั่งสารหรือเอนไซม์บางชนิดที่มีคุณสมบัติคล้ายกับเอนไซม์ peroxidase จึงทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อทุกเซกชันหรือกับแอนติบอดีทุกชนิดที่มีความเข้มข้นสูง แต่เมื่อหยดด้วย 1 % H_2O_2 ผลก็คือไม่เกิดตะกอนสีน้ำตาล เนื่องจาก 1 % H_2O_2 ที่หยดลงไปเกิดการเกิดการเร่งปฏิกิริยาโดยสารที่มีในเนื้อเยื่อทำให้ H_2O_2 กลายเป็นออกซิเจนกับน้ำโดยถูกออกซิเจนออกซิไดซ์ในเนื้อเยื่อนั้น (ตาราง 4 และภาพประกอบ 17,18)

นอกจากนี้ยังพบตะกอนสีน้ำตาลที่บริเวณเนื้อเยื่อของหอยทั้ง 2 วงศ์ คือ หอยมะระ ในวงศ์ Muricidae กับหอยเจดีย์ 1 และหอยเจดีย์ 2 ในวงศ์ Thiaridae ซึ่งเป็นตำแหน่งที่หยดด้วยโม

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง 4 ชนิด และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสเอชพีวี แต่ไม่พบตะกอนสีน้ำตาลหรือติดสีน้ำตาลน้อยมาก เมื่อทดลองใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในหอยบางตัว เมื่อทำการทดลองซ้ำในครั้งที่ 2 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ไม่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ พบว่าเกิดตะกอนสีน้ำตาลที่ตำแหน่งเดียวกัน และเมื่อทำการทดลองซ้ำอีกเป็นครั้งที่ 3 โดยได้เจือจางโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง 4 ชนิด ด้วยสารละลาย P_1^+ จากเดิม 1:5 เป็น 1:20 ปรากฏว่าไม่พบตะกอนสีน้ำตาลที่บริเวณเนื้อเยื่อที่บริเวณเดิม จึงสรุปได้ว่าตำแหน่งที่ติดสีน้ำตาลไม่ได้ติดไวรัสหัวเหลืองอย่างแน่นอน แต่เป็นการจับแบบไม่จำเพาะ เมื่อใช้แอนติบอดีที่มีความเข้มข้นสูง (ตาราง 5 และภาพประกอบ 19,20,21)

อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองในครั้งนี้ จึงใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้แก่ VH19-10B, VH3-3H และ VH30-10D (Phianphak; et al. 2005 : 161) ซึ่งก็ให้ผลเหมือนกับการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสทั้งสามชนิด (ตาราง 6 และภาพประกอบ 22) ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้งได้ใช้ตัวควบคุมผลบวก (positive control) คือ เนื้อเยื่อส่วนหัวกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองหลังจากการฉีดเป็นเวลา 3 วัน และเนื้อเยื่อส่วนหัวกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงหลังจากการฉีดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 24)

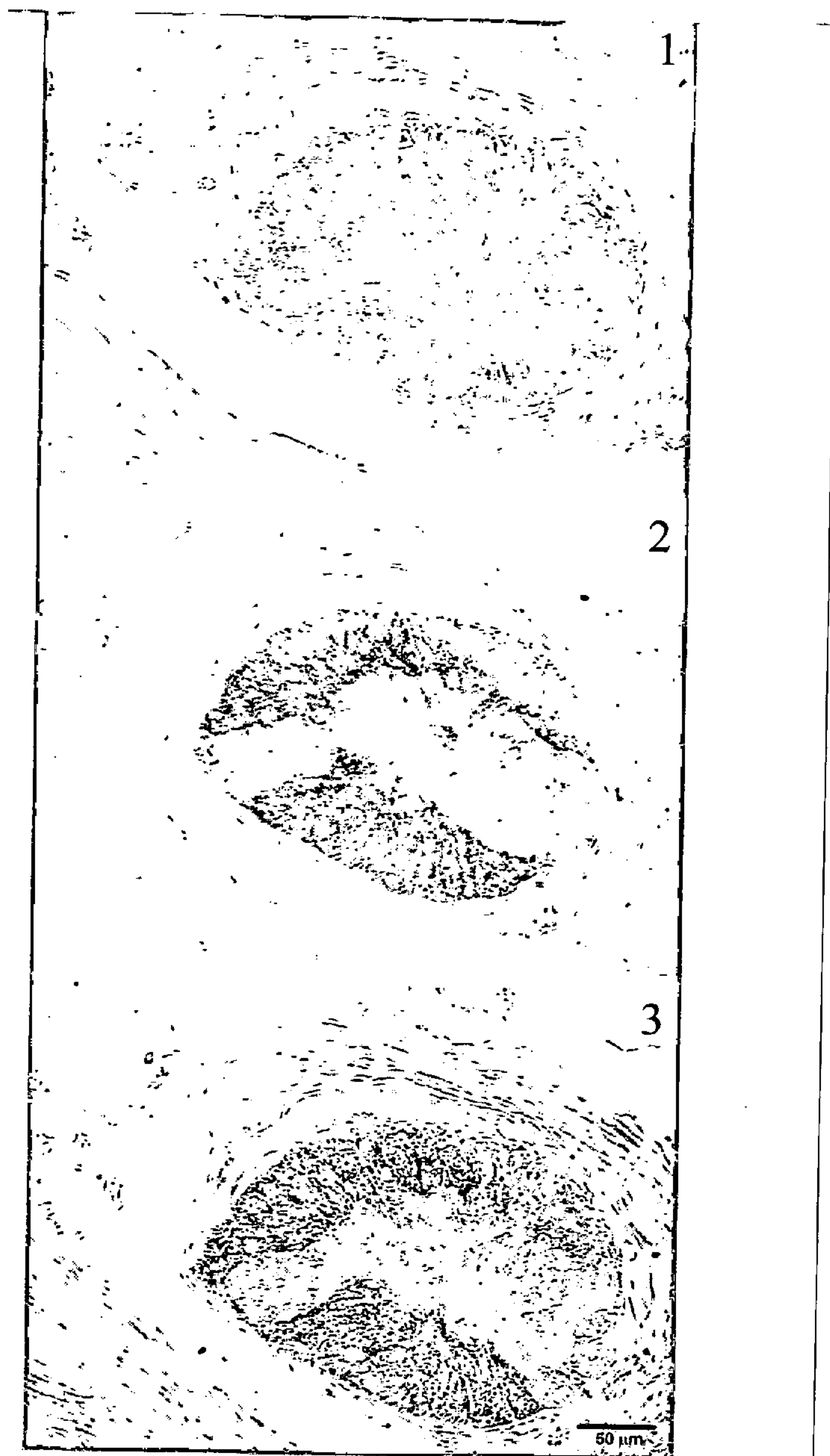


ภาพประกอบ 17 แสดงการหยด 1 % H₂O₂, GAM-HRP และโมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (เจือจางด้วยสารละลาย P₁⁺ ปริมาณ 1:5)

ตาราง 4 แสดงผลการติดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*) หอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*) เมื่อหยด 1 % H₂O₂ และ GAM-HRP เป็นตัวควบคุม

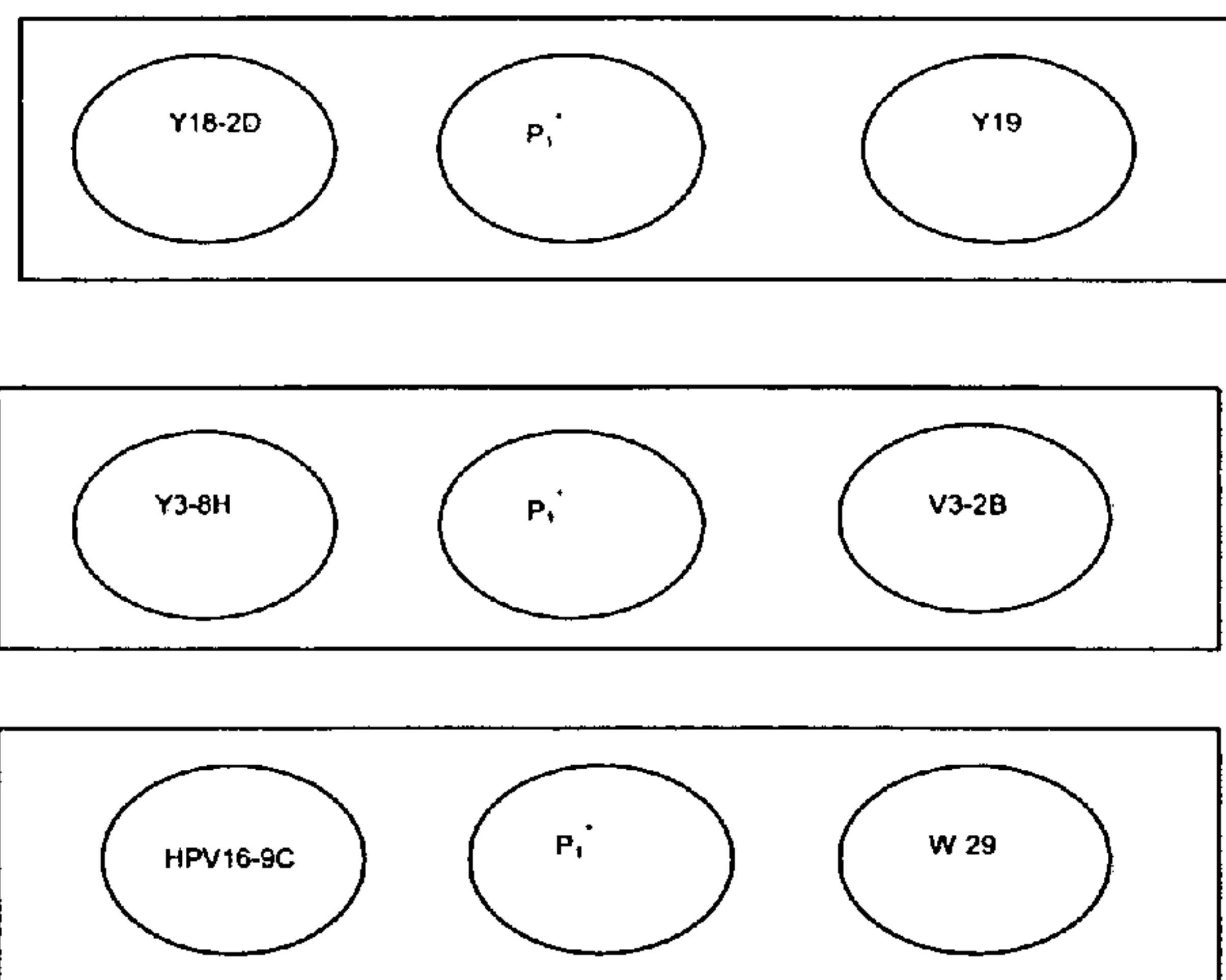
ชนิดของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง หรือสารตัวที่หนึ่ง ที่หยดบนสไลด์ ชื่อสัตว์/ตัวที่	Y18	Y19	W29	HPV 16-9C	1%H ₂ O ₂	GAM- HRP	P ₁ ⁺	หมายเหตุ
หอยเจดีย์ 1 (<i>Melanoides tuberculata</i>)	+	+	+	+	-	+	+	
หอยเจดีย์ 2 (<i>Sermyla riqueti</i>)	+	+	+	+	-	+	+	

+ ติดสีน้ำตาลที่ตำแหน่งเดียวกัน - ไม่ติดสีน้ำตาล



ภาพประกอบ 18 Immunohistochemistry แสดงเนื้อเยื่อบริเวณ mucous gland ของหอยเจดีย์ 2 (*Sermylea riqueti*) ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่เชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 5 วัน แต่พบตะกอนสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อ ซึ่งไม่ใช่ตำแหน่งของไวรัสหัวเหลือง

ให้ 1 = หยด 1 % H_2O_2 2 = หยด P_1^+ 3 = หยด GAM-HRP

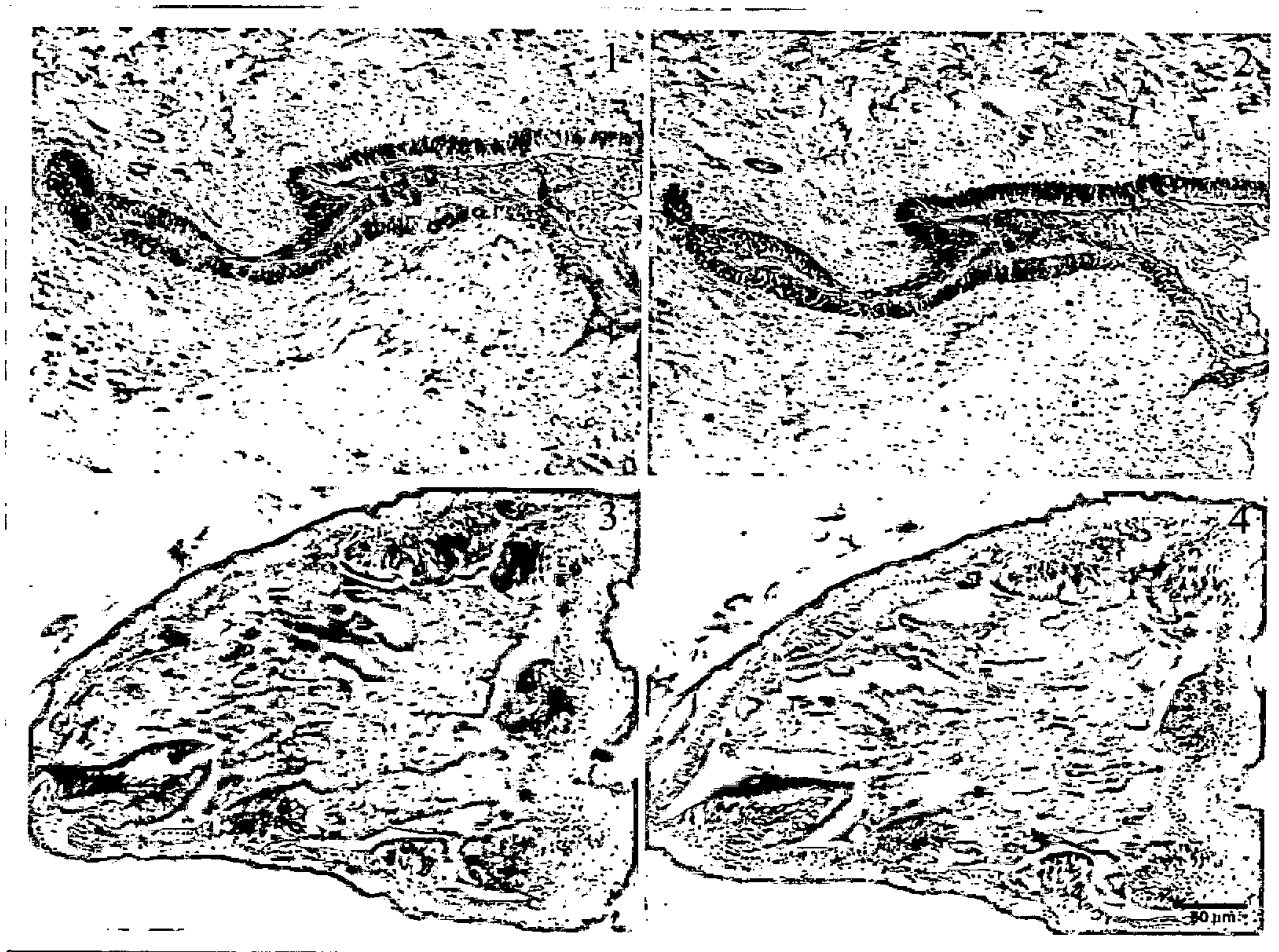


ภาพประกอบ 19 แสดงการหยด 1 ไมโนโคลนอลแอนติบอดีตัวที่หนึ่งซึ่งเจือจางด้วย สารละลาย P₁⁺ ปริมาณ 1:5 บนเนื้อเยื่อของหอยมะระ (*Thais* sp.)

ตาราง 5 แสดงผลการติดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อของหอยมะระ (*Thais* sp.) โดยใช้ไมโนโคลนอล แอนติบอดีตัวที่หนึ่งซึ่งเจือจางด้วยสารละลาย P₁⁺ ปริมาณ 1:5

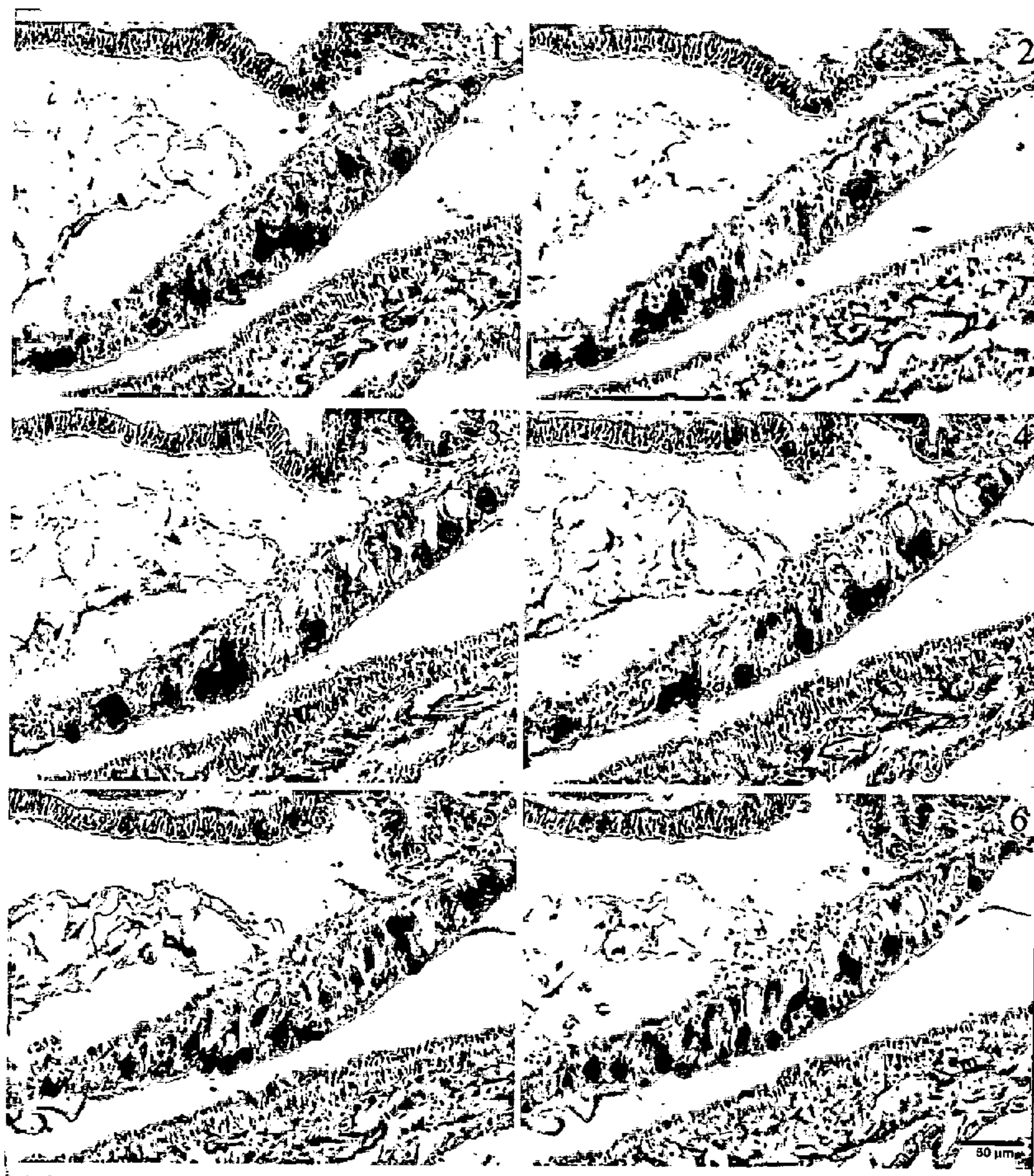
ชนิดของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง หรือสารตัวที่หนึ่ง ที่หยดบนสไลด์ ชื่อสัตว์/ตัวที่	Y18	Y19	W29	HPV 16-9C	V3-2B	Y3-8H	P ₁ ⁺	หมายเหตุ
หอยมะระ (<i>Thais</i> sp.) ตัวที่ 1	+	+	+	+	+	+	-	
หอยมะระ (<i>Thais</i> sp.) ตัวที่ 2	+	+	+	+	+	+	-	

+ ติดสีน้ำตาลที่ตำแหน่งเดียวกัน - ไม่ติดสีน้ำตาล



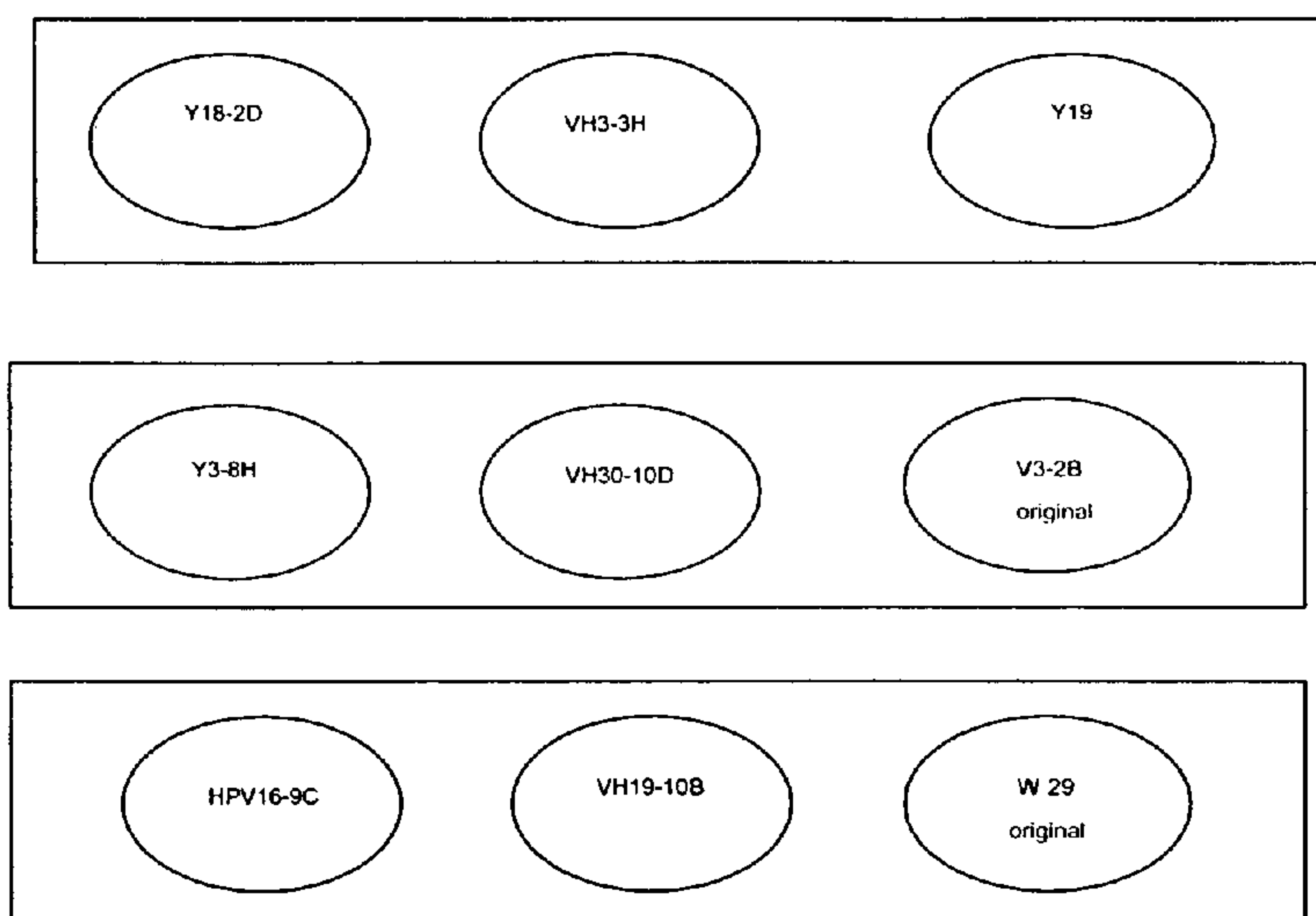
ภาพประกอบ 20 Immunohistochemistry แสดงเนื้อเยื่อของหอยมะระ (*Thais* sp.) ที่ฉีดเชื้อไวรัส
 ห้วเหลืองเป็นเวลา 3 วัน พบตะกอนสีน้ำตาลซึ่งไม่ใช่การติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง
 (1 และ 2 คือ เยื่อผิวหนังบริเวณ foot 3 และ 4 คือ เนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหาร)

- หยุด 1 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D ซึ่งจำเพาะต่อ gp64 ของไวรัสหัวเหลือง
 2 = สารละลาย P_1^+
 3 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ซึ่งจำเพาะต่อ gp116 ของไวรัสหัวเหลือง
 4 = สารละลาย P_1^+



ภาพประกอบ 21 Immunohistochemistry แสดงเนื้อเยื่อบริเวณเยื่อบุผิวข้างลำตัวของหอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*) ที่ให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่เชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 5 วัน ครั้งที่ 1 พบตะกอนสีน้ำตาลซึ่งไม่ใช่การติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

- 1 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D ซึ่งจำเพาะต่อ gp116 ของไวรัสหัวเหลือง
- 2 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ซึ่งจำเพาะต่อ p20 ของไวรัสหัวเหลือง
- 3 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y3-8H ซึ่งจำเพาะต่อ gp116 ของไวรัสหัวเหลือง
- 4 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี W29 ซึ่งจำเพาะต่อ VP28 ของไวรัสตัวแดงดวงขาว
- 5 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ซึ่งจำเพาะต่อ gp116 ของไวรัสหัวเหลือง
- 6 = โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C ซึ่งจำเพาะต่อไวรัสเอชพีวี

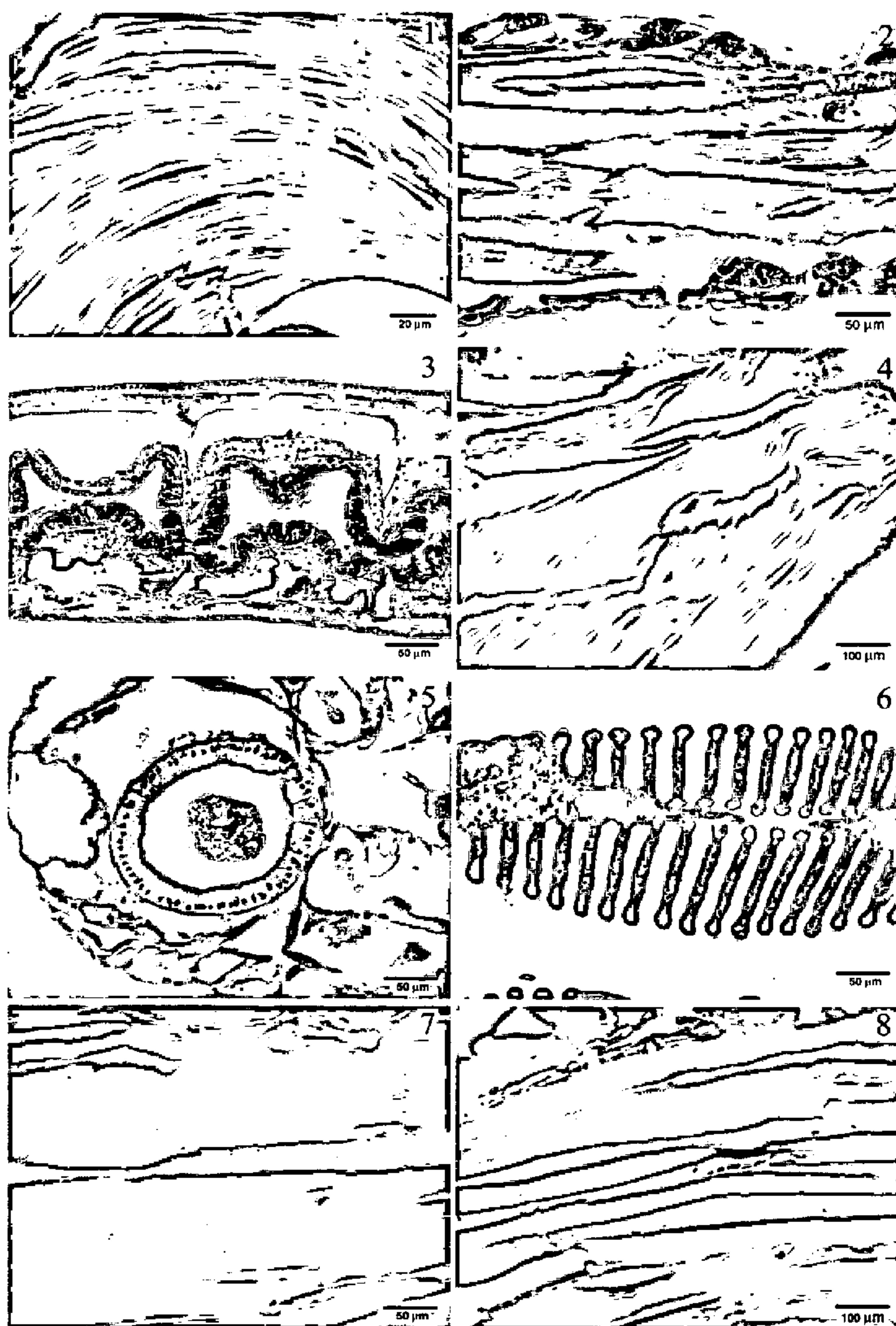


ภาพประกอบ 22 แสดงการหัดโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส และแบคทีเรีย (*Vibrio harveyi*) ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:5

ตาราง 6 แสดงผลการติดสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*) และหอยมะระ (*Thais sp.*) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส และแบคทีเรีย ที่เจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ ปริมาณ 1:5

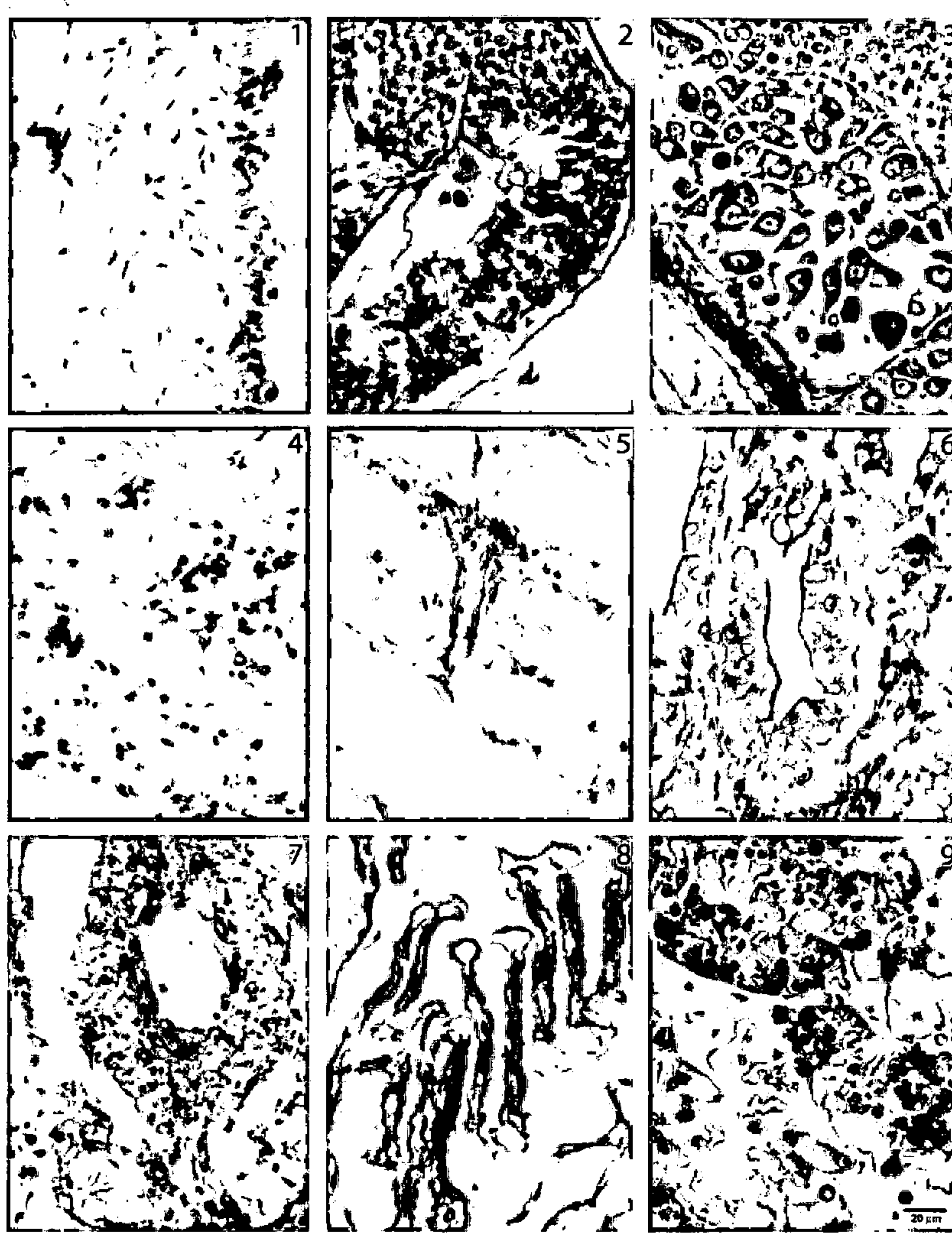
ชนิดของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง หรือสารตัวที่หนึ่ง ที่หยดบนสไลด์ ชื่อสัตว์/ตัวที่	Y18	Y19	W29	HPV 16-9C	V3- 2B	Y3- 8H	VH3- 3H	VH30 -10D	VH19 -10B
หอยเจดีย์ 1 (<i>Melanoides tuberculata</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
หอยมะระ (<i>Thais sp.</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ ติดสีน้ำตาลที่ตำแหน่งเดียวกัน - ไม่ติดสีน้ำตาล



ภาพประกอบ 23 Immunohistochemistry แสดงเนื้อเยื่อของสัตว์ชนิดต่างๆที่นำมาทดลองให้ติดเชื้อโดยการฉีดและให้กินเนื้อกิ้งกูดดำที่เชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Y19) ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

- | | |
|--|--|
| 1 = กล้ามเนื้อของไรแดง (<i>Moina macrocopa</i>) | 2 = กล้ามเนื้อของหนอนแดง (<i>Chironomus</i> sp.) |
| 3 = ทางเดินอาหารของไส้เดือนแดง (<i>Lumbriculus variegatus</i>) | 4 = กล้ามเนื้อของแอมฟิพอด (<i>Gammarus</i> sp.) |
| 5 = ทางเดินอาหารของไรน้ำเค็ม (<i>Artemia salina</i>) | 6 = เหงือกของกุ้งกะปิ (<i>Caridina</i> sp.) |
| 7 = กล้ามเนื้อของตัวอ่อนแมลงปอเขี้ยว (<i>Ischnura</i> sp.) | 8 = กล้ามเนื้อของแมงดาหางกลม (<i>Carcinoscopus rotundicauda</i>) |



ภาพประกอบ 24 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของเนื้อเยื่อส่วนหัวของกิ้งกูดดำที่ฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Y19) ซึ่งพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองบริเวณที่เห็นเป็นสีน้ำตาล

- | | |
|------------------------------|-------------------|
| 1 = เนื้อเยื่อบุใต้ผิวหนัง | 2 = อัณฑะ |
| 3 = รังไข่ | 4 = หัวใจ |
| 5 = กล้ามเนื้อ | 6 = ตับและตับอ่อน |
| 7 = อวัยวะน้ำเหลือง | 8 = หลอด |
| 9 = เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด | |

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการทดลองได้เก็บรวบรวมสัตว์ในฟาร์มต่างๆ จำนวน 3 ฟาร์ม จากแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำและตามชายฝั่งทะเลเขตป่าชายเลนในอำเภอเมือง อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ เขตวังสิด คลอง 8 จังหวัดปทุมธานี และจากตลาดสวนจตุจักร จังหวัดกรุงเทพฯ ประกอบด้วย ฟาร์ม Arthropoda: class Crustacea ได้แก่ กุ้งกะปิ (*Caridina* sp.) แอมฟิพอด (*Gammarus* sp.) ไรน้ำเค็ม (*Artemia salina*) ไรแดง (*Moina macrocopa*) class Insecta ได้แก่ หนอนแดง (*Chironomus* sp.) และตัวอ่อนแมลงปอเข็ม (*Ischnura* sp.) class Merostomata ได้แก่ แมงดาหางกลม (*Carcinoscorpius rotundicauda*) ฟาร์ม Annelida: class Oligochaeta ได้แก่ ไส้เดือนแดง (*Lumbriculus variegatus*) ฟาร์ม Mollusca: class Gastropoda ได้แก่ หอยมะระ (*Thais* sp.) หอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*) และหอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*) ซึ่งสามารถรวบรวมสัตว์ได้ทั้งหมด 11 วงศ์ จำแนกได้ 12 ชนิด

แล้วนำมาตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในสัตว์เหล่านี้ ที่รวบรวมมาจากธรรมชาติ (0 วัน) และจากการทดลองโดยให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและการฉีดไวรัสหัวเหลืองเข้าสู่สัตว์โดยตรง เมื่อนำไปเลี้ยงโดยเก็บตัวอย่างของสัตว์ทดลองในวันที่ 3 5 10 และ 30 ตามลำดับ เพื่อนำไปตรวจหาการติดเชื้อไวรัส แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 ชนิด ได้แก่ Y3-8H, V3-2B, Y18-2D และ Y19 (Sithgorngul, et al. 2000 : 27. ; Sithgorngul, et al. 2002 : 71) ซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสหัวเหลืองขนาด gp116 (เดิมเรียก p135) gp64 (เดิมเรียก p67) และ p20 (เดิมเรียก p22) ตามลำดับ (Jitrapakdee, et al. 2003 : 863) ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสอื่นอีก 2 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ด้วย ได้แก่ HPV16-9C จำเพาะต่อโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสเอชพีวี (Rukpratanporn, et al. 2005 : 85) กับ W29 จำเพาะต่อโปรตีน VP28 ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไวรัสตัวแดงดวงขาว (Chaivisuthangkura, et al. 2004 : 359) และผลจากการตรวจดูลักษณะเนื้อเยื่อของอวัยวะของสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ดับและตับอ่อน หัวใจ กล้ามเนื้อ ทางเดินอาหาร รังไข่ เหนือก ซึ่งเป็อวัยวะที่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสูงกว่าบริเวณอื่น (Lu, Tapay & Loh. 1995 : 67. ; Chantanachookin, et al. 1993 : 145) แต่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองภายในเนื้อเยื่อของอวัยวะดังกล่าว ซึ่งก็ไม่พบการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีกับไวรัสตัวแดงดวงขาวภายในเนื้อเยื่อของอวัยวะชนิดต่างๆเช่นกัน ซึ่งในการตรวจดูลักษณะการติดสีน้ำตาลภายในเนื้อเยื่อต่างๆเหล่านั้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าไวรัสแต่ละชนิดจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่แตกต่างกัน เพราะมีสารพันธุกรรมต่างกัน โดยไวรัสหัวเหลืองเป็น RNA virus จึงมีการเพิ่มจำนวนไวรัส (virus replication) ภายในไซโทพลาสซึมซึ่งจะเห็นลักษณะของการติดสีน้ำตาลภายในเซลล์ตรงส่วนที่เป็นไซโทพลาสซึม (Wongteera -

supaya, et al. 1995 : 49. ; Nadala, Tapay & Loh. 1997 : 142-143) ส่วนไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสเอชพีวีเป็น DNA virus จะมีการเพิ่มจำนวน (virus replication) ภายในนิวเคลียส ถ้าในเนื้อเยื่อของสัตว์ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจะเห็นลักษณะของการติดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียส ซึ่งนิวเคลียสจะบวมโตผิดปกติตามอวัยวะต่างๆ (Chen, et al. 2000 : 159) สำหรับไวรัสเอชพีวีการติดเชื้อจะพบบริเวณตับและตับอ่อน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อน ซึ่ง inclusion ของไวรัสจะมีขนาดใหญ่เกือบเต็มนิวเคลียส (Bonami, et al. 1995 : 816. ; Spann, et al. 1997 : 240. ; Sukhumsirichartal, et al. 1999 : 1. ; Rukpratanporn, et al. 2005 : 85) เมื่อทำการตรวจสอบเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองด้วยวิธี RT-PCR ก็ให้ผลลบเช่นเดียวกัน

จากการทดลองครั้งนี้ให้ผลบวกปลอม คือ พบการเกิดตะกอนสีน้ำตาลคล้ายกับการติดไวรัส ภายในเนื้อเยื่อของหอยวงศ์ Muricidae ได้แก่ หอยมะระ และหอยวงศ์ Thiaridae ได้แก่ หอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*) และหอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*) ซึ่งเมื่อทดลองซ้ำ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง (Y3-8H, V3-2B, Y18-2D และ Y19) โดยเจือจางด้วยสารละลาย P_1^+ จากเดิม 1:5 ไปเป็น 1:20 เมื่อตรวจดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าตำแหน่งเดิมบนเนื้อเยื่อไม่ติดสีน้ำตาลเลย จึงสรุปว่าเป็นการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีที่ความเข้มข้นสูง และเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย (*Vibrio harvyi*) ก็ให้ผลเหมือนกัน (Phianphak, et al. 2005 : 161)

นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่าหอยเจดีย์ 1 และหอยเจดีย์ 2 มีเนื้อเยื่อบางชนิดที่สร้างสารที่มีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ peroxidase (endogenous peroxidase) ซึ่งคาดว่าหอยสองชนิดนี้มีการสร้างสารขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของหอยกลุ่มนี้

จากการนำสัตว์ชนิดต่างๆที่พบในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ได้แก่ กุ้งกะปิ แมงดาหางกลม แอมฟิพอด ตัวอ่อนแมลงปอเข็ม หอยมะระ หอยเจดีย์ 1 และหอยเจดีย์ 2 ไรน้ำเค็ม ไรแดง หนอนแดง และไส้เดือนแดง มาตรวจสอบการติดเชื้อในครั้งนี้ เพื่อต้องการทราบว่าสัตว์เหล่านี้มีเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งอาจติดมาตามธรรมชาติได้หรือไม่ ซึ่งถ้าพบว่ามี การติดเชื้อในสัตว์เหล่านี้แล้วก็อาจเป็นไปได้ว่าสัตว์ชนิดต่างๆเหล่านี้น่าจะมีศักยภาพในการเป็นพาหะของโรคหัวเหลือง ซึ่งจากการทดลองไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติและจากการทดลองในสัตว์ทดลองทั้ง 11 ชนิด และสำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้เป็นอาหารสดสำหรับเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ ไรแดง หนอนแดง ไส้เดือนแดง และไรน้ำเค็ม ที่นำมาจากตลาดโดยได้มาจากฟาร์มการเพาะเลี้ยงซึ่งไม่ได้รวบรวมมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งตามธรรมชาติจริง เนื่องจากปัจจุบันสภาพของสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปมาก จึงทำให้ปริมาณสัตว์ขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในน้ำลดจำนวนลงไม่เพียงพออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งและสัตว์น้ำ ถ้าสามารถนำไรแดง หนอนแดง ไส้เดือนแดง และไรน้ำเค็มจากธรรมชาติหรือนำมาจากบ่อที่มีการระบามาตรวจสอบอาจจะพบการติดเชื้อไวรัสตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามเมื่อนำสัตว์เหล่านี้มาทดลองเลี้ยงให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงคาดว่าสัตว์เหล่านี้ น่าจะสามารถทนทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้

เป็นที่ทราบกันดีว่าในปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีหรือยาชนิดใดรักษาได้ ซึ่งจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไวรัสที่ก่อโรคในกุ้งและพาหะชนิดต่าง ๆ นั้น พบว่ามีสัตว์หลายชนิดที่อาศัยอยู่ตามบ่อเลี้ยงกุ้งซึ่งเป็นพาหะของไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งหลายชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว การป้องกันจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด และจำเป็นต้องมีการกำจัดสัตว์ที่เป็นพาหะของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ รวมถึงการจัดการคุณภาพของน้ำ บ่อเลี้ยง และสภาพของสิ่งแวดล้อม เป็นต้น เพื่อเป็นการช่วยควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคที่เกิดเชื้อไวรัสในกุ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกุ้งกุลาดำนับว่าเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ความพยายามในการหาแนวทางการจัดการและควบคุมปัญหาต่างๆ ก็เพื่อให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำนี้ได้สร้างรายได้แก่ชาวประมงและประเทศไทยอย่างยั่งยืนต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กัลยานี ยงจินดารัตน์. (2531). การกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดพังงา. ปรินญาณิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- จำนง ธีรวุฒิ. (2546, กรกฎาคม). หนอนแดง. วารสารการประมง. (ออนไลน์). 33(2) : 215 - 218. แหล่งที่มา: <http://www.nicaonline.com/new-190.htm>. วันที่สืบค้นวันที่ 6 มิถุนายน 2546.
- ยัยนั บ แวและ. (2545). การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ *Palaemonidae Penaeidae* และ *Atyidae* โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี. ปรินญาณิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- บพิธ จารุพันธุ์. (2529). ปฏิบัติการสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์อมรการพิมพ์.
- บพิธ จารุพันธุ์และนันทพร จารุพันธุ์. (2546). สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง//แอนเนลิด ถึง โพรโทคอร์ดาตา. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิสุทธิ เอกอำนวย. (2541). แมลงปอของไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เลิฟแอนด์ลิฟเพรส จำกัด
- ไพฑูรย์ สุขศรีงาม. (2521). แมลง: การจัดหมวดหมู่แมลงและการป้องกันกำจัด. มหาสารคาม: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- วีระวรรณ สิทธิกรกุล. (2542). ชีวเคมีของฮอร์โมน. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- สิทธิ บุญยรัตผลิน; และคนอื่นๆ. (2535). Baculovirus สาเหตุโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง ระหว่างวันที่ 16-19 กันยายน 2535 ณ ห้องประชุมสถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. หน้า 200-205. กรุงเทพฯ.
- สิทธิ บุญยรัตผลิน. (2536, เมษายน). ผลผลิตกุ้งเลี้ยงไทยปี 2535 จะเพิ่มขึ้นได้ด้วยวิธีการป้องกันโรคหัวเหลือง. ข่าวกุ้ง. 50(57) :1-2.
- สิริ ทุกข์วินาศ; และ ชุติมา ขมวิลัย. (2545, พฤษภาคม – มิถุนายน). แนวทางการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย. วารสารการประมง. (ออนไลน์). 3(55). แหล่งที่มา: http://www.nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=122. วันที่สืบค้น วันที่ 15 มิถุนายน 2546.
- สุชาติ อุปถัมภ์; และคนอื่นๆ. (2538). สังขวิทยา. กรุงเทพฯ: ศักดิ์โสดาการพิมพ์.

- สุดา ชูถิ่น. (2547). การตรวจสอบการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium*. วิทยานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- สุณีรัตน์ ศรีธามัน. (2547). ศักยภาพในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูวงศ์ Grapsidae Portunidae Leucosiidae Paguridae Ocypodidae และ Parathelphusidae. วิทยานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ; และคนอื่นๆ. (2537). อิมมูโนวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : เค.พี. พรินติ้ง จำกัด.
- Brandt,R.A.M. (1974). *The non-marine aquatic Mollusca of Thailand*. Archiv fur Molluskenkunde. 105 : 1-423.
- Bonami, J.R.; et al. (1995, April). Characterization hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic of penaeid shrimps. *Journal of General Virology*. 76 : 813-817.
- Chaivisuthangkura, P.; et al. (2004, August). Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. *ScienceAsia* . 30 : 359-363.
- Chantanachookin, C.; et al. (1993, November). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow head disease. *Diseases of Aquatic Organisms*. 17 : 145-157.
- Chen, L.L.; et al. (2000,March). 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.
- Cowley, J. A.; et al. (1999,May). Yellow head virus from Thailand and gill-associated virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses *Diseases of Aquatic Organisms*. 36 : 153-157.
- Cowley, J. A.; et al. (2000,February). Detection of Australian gill-associated virus (GAV) and lymphoid organ virus (LOV) of *Penaeus monodon* by RT-nested PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*. 39 : 159-167.
- Cowley, J. A.; et al. (2002,July). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 50 : 95-104.

- Drewes, C. (2003). *Lumbriculus variegates : A Biology Profile*. (Online). Available: <http://www.eeob.iastate.edu/faculty/DrewesC/htdocs/Lvgen4.htm>. Retrieved March 7, 2004.
- Flegel, T.W.; et al. (1995). "Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*." In *Swimming through troubled water; '95*, eds Browdy, C.L. & Hopkins, J.S. pp. 76-83. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society.
- Flegel, T.W.; Boonyarapalin, S.; & 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*, pp. 285 - 02. Manila, Philippines : .
- Jitrapakdee, S.; et al. (2003, April). Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. *Journal of General Virology*. 84 : 863-873.
- Lo, C.F.; et al. (1996, January). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of Aquatic Organisms*. 27 : 215-225.
- Lu, Y.; et al. (1995, September). Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organ 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. *Journal of Fish Diseases*. 19 : 9-13.
- Marks, H.; et al. (2003, June). Transcriptional analysis of the white spot syndrome virus major virion protein genes. *Journal of General Virology*. 84 : 1517-1523.
- Mayo, M.A. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archive of Virology*. 147 : 1655-1656.
- Nadala, E.C.B.JR; et al. (1997, July). 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; Tapay, L.M. & Loh, P.C. (1997, November). Yellow-head virus : a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 141-146.

- Phianphak, W.; et al. (2005, February). Production of monoclonal antibodies for detection of *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63 (2-3) : 161-168.
- Rukpratanporn, S.; et al. (2005, June). Generation of monoclonal antibodies specific to hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65 : 85-89.
- Sahul Hameed, A.S.; Charles, M. X. & Anilkumar, M. (2000, August). Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* of white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 183 : 207-213.
- Sithigorngul, P.; et al. (2000, August). Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 42 : 27-34.
- Sithigorngul, P.; et al. (2002, April). Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49 : 71-76.
- Sittidilokratna, N.; et al. (2002, July). Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus in an invertebrate nidovirus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 50 : 87-93.
- Spann, K.M.; et al. (1997, December). Hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) of *Penaeus japonicus* cultured in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 239-241.
- Sukhumsirichart, W.; et al. (1999, October). Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*. 38 : 1-10.
- Supamattaya, K.; et al. (1998, March). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelegicus*, mud crab *Scylla serrata* and Krill *Acetes* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32 : 79-85.
- Wongteerasupaya, C.; et al. (1995, May). Yellow head virus of *Penaeus monodon* is RNA virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22 : 45-50.
- Wongteerasupaya, C.; et al. (1997, December). Detection of yellow head virus of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 181-186.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

Gelatin	1.00	กรัม
Chrom alum (chromium potassium sulphate)	0.05	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตร เป็น	100.00	มิลลิลิตร

2. Davidson's fixative

95 % Ethyl alcohol	30.00	มิลลิลิตร
100 % Formalin	20.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.00	มิลลิลิตร
Distilled water	30.00	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 ·7H ₂ O	1.15	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตรเป็น	1000.00	มิลลิลิตร

4. สารละลาย Calf Serum 10 % (P₁⁺)

Calf serum	10.00	มิลลิลิตร
PBS	100.00	มิลลิลิตร

5. สี Enrich's acid hematoxylin

Hematoxylin	8.00	กรัม
95 % Ethyl alcohol	400.00	มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8.00	กรัม
Distilled water	400.00	มิลลิลิตร
Glycerine	400.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.00	มิลลิลิตร

6. 0.2 % Eosin Y ใน 95 % Ethyl alcohol

Eosin Y	0.2	กรัม
95% Ethyl alcohol	100.00	มิลลิลิตร

7. เชื้อไวรัสหัวเหลือง เจือจาง 1:500 ด้วย 2X PBS

เชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง		
ปราศจากเชื้อ ขนาดรู 0.45 ไมโครมิลลิเมตร	1.00	ไมโครลิตร
2XPBS	499.00	ไมโครลิตร

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

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

9. Working solution

ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ สัดส่วนนี้พอดีสำหรับตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง		
Poly(A)carrier RNA	50.00	ไมโครลิตร
Binding buffer	2.50	มิลลิลิตร

10. Poly(A)carrier RNA

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

11. Binding buffer

เตรียมในปริมาตร	25.00	มิลลิลิตร
Guanidine-HCl	6.00	โมลาร์
Urea	10.00	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl	10.00	มิลลิโมลาร์
20 % Triton X-100(v/v), pH4.4	5.00	กรัม

12. Proteinase K

Lyophilized proteinase K	90.00	มิลลิกรัม
Elution buffer	5.00	มิลลิลิตร
ควรเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

13. Inhibitor removal buffer

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

14. Wash buffer

เตรียมในปริมาตร	20.00	มิลลิลิตร
NaCl	20.00	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl , pH 7.5	2.00	มิลลิโมลาร์
เมื่อจะใช้เติมด้วย		
Ethanol บริสุทธิ์	40.00	มิลลิลิตร

15. Elution buffer

Nuclease free double distilled water	30.00	มิลลิลิตร
--------------------------------------	-------	-----------

16. X 10 TBE buffer, pH 8.3

Tris-base	100.00	กรัม
Boric acid	55.00	กรัม
EDTA	9.50	กรัม
Distilled water	1000.00	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วยกรด HCl		

17. Ethidium bromide

Ethidium bromide	20.00	ไมโครลิตร
Distilled water	400.00	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ชนิดของสัตว์ในวงศ์ Atyidae, Artemiidae, Daphnidae, Gammaridae, Agrionidae, Chironomidae, Limulidae, Muricidae, Thiaridae และ Lumbriculidae

ชนิดของกุ้งในวงศ์ Atyidae เช่น กุ้งกะปิ

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

ลักษณะของกุ้งในวงศ์ Atyidae

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

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Artemiidae เช่น ไรน้ำเค็ม

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Anostraca
	Family	Artemiidae
	Genus	Artemia
	Scientific name	<i>Artemia salina</i>
	Common name	Artemia, Brine shrimp
	Thai common name	ไรน้ำเค็ม ไรสีน้ำตาล

ไรน้ำเค็มหรือไรสีน้ำตาล เป็นครัสเตเชียนขนาดเล็ก สามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็ม (salinity) ต่ำๆ จนกระทั่งในน้ำที่มีระดับความเค็มสูงๆ ได้แต่ไม่พบในทะเลเปิด ไรน้ำเค็มเหล่านี้นิยมใช้เป็นอาหารของพวกลูกกุ้งที่อยู่ในระยะตัวอ่อนที่ไม่สามารถกินอาหารชิ้นโตๆ ได้ โดยนำเอาไข่ของ ไรน้ำเค็มมาฟักในน้ำทะเลที่มีความเค็มประมาณ 30-35 ppt. ประมาณ 2-3 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อน ใช้เป็นอาหารเลี้ยงลูกกุ้งได้

ลักษณะภายนอก

ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ไม่มีเปลือกคาราเพส (carapace) คลุม ส่วนอกและท้องยังไม่แยกกันอย่างเด็ดขาด เรียกทั้งสองส่วนนี้รวมกันว่า trunk

ส่วนหัว ส่วนหัวของไรน้ำเค็มมีระยะ 5 คู่ เหมือนกับครัสเตเชียนทั่วไป คือประกอบด้วย Antennule เป็นแท่งสั้นๆขนาดเล็ก ปลายสุดมีขนเส้นเล็กๆ (bristle) ติดอยู่ทำหน้าที่เป็น chemmoreceptor

Antenna มีขนาดใหญ่กว่า antennule แต่ก็นับว่าสั้นและมีความหนามากกว่า antennule ไม่มีขน ในตัวผู้ปลายจะงอเป็นตะขอและเป็นแผ่นแบนใหญ่เหมือนใบไม้โค้งงอเพื่อใช้ยึดเกาะตัวเมียเวลาผสมพันธุ์

Mandible มีขนาดใหญ่ ไม่มี palp ทำหน้าที่ตัดอาหาร และนำอาหารเข้าสู่ปาก

Maxillule เป็นแผ่นรูปสามเหลี่ยม มีขน (setae) อยู่ตามขอบ

Maxilla มีขนาดเล็กมาก ปลายมีขน 3 เส้น

ส่วนอก ส่วนอกของไรน้ำเค็มมี 12 ปล้อง ปล้องที่ 1-11 จะมีระยะกว้างน้อยกว่า 11 คู่ ระยะกว้างกว่ามีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง (phyllopodium) ตามขอบจะมีขนเส้นเล็กๆจำนวนมากทำหน้าที่ในการกรองอาหาร ว่ายน้ำ และแลกเปลี่ยนแก๊ส ปล้องที่ 12 ของส่วนอกไม่มีขา ว่ายน้ำ แต่จะมีช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (genital opening) ปล้องที่ 12 นี้จะเชื่อมรวมกับส่วนท้องปล้องแรก (ปล้องที่ 13) และรวมเรียกปล้องทั้งสองซึ่งเชื่อมรวมกันเป็นปล้องเดียวกันนี้ว่า genital somite

ระยะข้อเป็นแบบ biramous มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ

Endopodite มี lobe ย่อยหลายอัน อันที่อยู่ทางด้านล่างจะมี setae ยาวและเส้นเล็กๆ เรียกว่า filter setae ส่วนแผ่นบนจะมี setae ขนาดใหญ่มีจำนวนน้อยและแข็งแรงเรียกว่า scraping setae ทำหน้าที่จับอาหารหรือคุ้ยเขี่ยอาหารตามพื้นท้องน้ำ

Exopodite มี lobe ขนาดใหญ่อยู่ด้านบนเรียกว่า flabellum ตามขอบมี setae ขนาดใหญ่ยาวเรียกว่า paddle setae ทำหน้าที่เหมือนเหงือกกับ proepipodite (exite) เป็นแผ่นบางๆ ระยะข้อทั้ง 11 คู่นี้จะชี้ไปทางด้านท้ายของลำตัวและมีช่องว่างระหว่างระยะข้อคู่หน้ากับระยะข้อคู่ถัดไปข้างหลัง ช่องว่างเหล่านี้จะเพิ่มหรือลดขนาดเมื่อระยะข้อโตไปมา การเปลี่ยนแปลงขนาดของช่องว่างระหว่างระยะข้อทำให้เกิดการไหลเวียนของน้ำ โดยน้ำจะไหลเข้ามาตามร่องกลางตัวด้านท้อง อาหารและออกซิเจนก็ปนเข้ามากับน้ำและไหลเข้าสู่ปาก ดังนั้นสัตว์เหล่านี้จึง

จำเป็นต้องว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลาเพื่อรับอาหารและแลกเปลี่ยนแก๊ส และมักหายใจต้องว่ายน้ำเพื่อให้
อาหารไหลเข้าสู่ปากได้สะดวก

ส่วนท้อง ส่วนท้องของไรน้ำเค็ม มี 6 ปล้อง ปล้องสุดท้ายมี telson ซึ่งปลายแตกเป็น 2
แฉก (caudal rami) ส่วนท้องนี้ไม่มีระยางค์

การขับถ่ายของเสีย

ใช้ maxillary gland เก็บรวบรวมของเสียและส่งออกภายนอกบริเวณ maxilla นอกจากนี้ยัง
ใช้ phagocytic cell พบทั่วไปในร่างกายโดยเฉพาะบริเวณ antenna เก็บรวบรวมของเสียพวกเม็ด
สีต่างๆ เซลล์ชนิดนี้ยังทำหน้าที่เก็บไขมันและไกลโคเจนอีกด้วย

การแลกเปลี่ยนแก๊สและระบบหมุนเวียนโลหิต

ไรน้ำเค็มมีหัวใจเป็นท่อยาวตลอดลำตัว หัวใจมี ostia 18 คู่อยู่ทางด้านข้าง ostia นี้รับเลือด
จาก pericardial sinus ซึ่งอยู่รอบๆ หัวใจ ส่วนอวัยวะในการแลกเปลี่ยนแก๊สคือระยางค์บริเวณอก
ระบบสืบพันธุ์

ไรน้ำเค็มมีเพศแยก ตัวผู้มีขนาดเล็กกว่าตัวเมียเล็กน้อยและมีอวัยวะเป็นท่อยาวๆ 1 คู่ อยู่
บริเวณปล้องที่ 14-17 ของลำตัว และมีท่อนำสเปิร์มส่งไปยัง penis ซึ่งเป็นท่อนอกขดไปมาและเปิด
ออกบริเวณ genital somite penis ยึดติดได้ดี โดยอาศัยแรงดันเลือด สามารถยื่นออกมานอกตัวได้
เวลาที่มีการผสมพันธุ์

ตัวเมียมีรังไข่อยู่บริเวณเดียวกับอวัยวะ รังไข่มีท่อเล็กๆ ไปเชื่อมต่อกับ lateral pouch ทาง
ด้านข้าง เนื้อเยื่อนี้จะมี ovisac ซึ่งโป่งออกเป็นถุงใหญ่เห็นชัดเจน เมื่อมีไข่ไข่จะยื่นออกมาเป็นถุง
เดี่ยวทางด้านท้องของ genital somite ไข่จะมีการผสมภายใน ovisac ด้านท้ายของ ovisac จะมี
ต่อมสร้างเปลือกไข่ (shell gland) เมื่อมีการลอกคราบก็จะปล่อยไข่ออกมาในน้ำ ไข่ของไรน้ำเค็มมี
สองประเภทคือ พวกที่มีเปลือกบางกับพวกที่มีเปลือกไข่หนา พวกที่มีเปลือกไข่บางจะพักภายใน
ovisac และกลายเป็นระยะ nauplius จึงดูเหมือนว่าออกลูกเป็นตัว (ovoviviparous) พวกที่มีเปลือก
ไข่หนาจะสามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี สามารถเก็บไว้ได้นานหลายปีโดยสามารถนำมาฟักได้ใน
น้ำทะเล ไข่ดังกล่าวฟักตัวอยู่ในระยะ gastrula ไข่ของไรน้ำเค็มเป็นที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
และมีการเพาะเลี้ยงเป็นการค้าอย่างแพร่หลาย (บพิช จารุพันธุ์. 2529 : 46-48)

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Daphnidae เช่น ไรแดง

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Cladocera
	Family	Daphnidae
	Genus	Moina
	Scientific name	<i>Moina macropopa</i>

Common name	Water flea
Thai common name	ไรแดง

ไรแดงเป็นไรน้ำที่พบทั่วไปตามบ่อ คูต่างๆเมื่อรวมกันมากๆ จะเห็นเป็นสีแดงเนื่องจากสารพวกฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ซึ่งอยู่กระจายทั่วร่างกาย จึงเรียกชื่อสามัญว่า ไรแดง สารฮีโมโกลบินนี้จะมีปริมาณเมื่อน้ำในบริเวณนั้นมีออกซิเจนน้อย ถ้ามีออกซิเจนมากปริมาณของฮีโมโกลบินจะน้อย ดังนั้นในน้ำที่สะอาดจะพบว่าไรพวกนี้มีสีน้ำตาลอ่อนๆ แต่ในน้ำเน่าๆ จะเห็นว่าไรแดงจะมีสีเข้มชัดเจนมาก ไรแดงเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เนื่องจากนิยมใช้เป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนและพวกลูกปลาต่างๆ

ลักษณะภายนอก

ลำตัวที่มีลักษณะแบนทางด้านข้าง มีคาราเพส คลุมส่วนนอกเอาไว้ ส่วนท้องที่มีขนาดเล็กมากไม่เป็นปล้องๆ และอยู่ภายใต้เปลือก โดยทั่วไปลำตัวแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ

ส่วนหัว ไม่มีคาราเพสคลุม มีลักษณะค่อนข้างกลม ไม่มีลักษณะเป็นปากนก (beak) เหมือนในสกุล *Daphnia* ระวังค์ที่พบบนส่วนหัวคือ

Antennule อยู่บนปล้องที่ 2 ของส่วนหัว อยู่เหนือช่องปากเล็กน้อย มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ ข้อเดียว ปลายสุดมี sensory bristle ติดอยู่ ในตัวผู้มี antennule ขนาดใหญ่

Antenna มีขนาดใหญ่มากทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ มีลักษณะเป็น biramous มีแขนงคือ exopodite ซึ่งมี 4 ข้อ และ endopodite มี 3 ข้อ ทั้ง exopodite และ endopodite จะมี bristle ยาว ๆ เรียกว่า plumose bristle

Mandible เป็นแท่งสั้นๆ ขนาดใหญ่ปิดส่วนปากเอาไว้

Maxilla อยู่ใต้ mandible บนส่วนหัวจะมีตา รวมอยู่ 1 อัน ตาประกอบด้วย lateral eye 2 อัน มารวมกันตั้งแต่ตอนที่ยังเป็นตัวอ่อนอยู่ ตา รวมประกอบไปด้วย ommatidium จำนวนมาก ตาย่อยแต่ละตาจะมี pigment สีดำ สามารถขยับไปมาได้ ซึ่งสังเกตได้ชัดเจนเมื่อยังมีชีวิตอยู่ ตา รวมมีก้านตาสั้นๆ มี optic nerve อยู่ภายในก้านตานี้

ส่วนอก เป็นส่วนที่ถูกคาราเพสคลุมเอาไว้ทั้งหมด คาราเพสมีลักษณะเป็นแผ่นบางใส 2 แผ่นยึดติดกันทางด้านหลังบริเวณอก 2 ปล้องแรกเท่านั้น ทางด้านท้องจะเปิดให้ระยางค์อกยื่นออกมาได้ ส่วนอกมี 6 ปล้องแต่มีระยางค์เพียง 5 คู่คือ

คู่ที่ 1 มีขนาดเล็ก มี bristle ยาวติดอยู่ตรงปลาย

คู่ที่ 2 เป็นแผ่นแบนคล้ายคู่ที่ 1 แต่มีขนาดใหญ่กว่า

คู่ที่ 3-4 มีขนาดใหญ่ที่สุดทางด้านข้างมี filter setae จำนวนมากเรียงเป็นแถวทำหน้าที่ในการกรองอาหาร

คู่ที่ 5 เป็นแผ่นแบนๆ ขนาดเล็ก ส่วนของ exite จะงอขึ้นข้างบน มี bristle สั้นๆ ติดอยู่ตามขอบ ระวังค์คู่นี้ทำหน้าที่ในการ

แลกเปลี่ยนแก๊สด้วย

ไรแดงไม่มีส่วนท้องที่แท้จริง แต่จะมีลักษณะเป็นแผ่นงอขึ้นข้างบน ปลายสุดแยกเป็น 2 แฉกเรียกว่า caudal rami และบริเวณตอนท้ายๆ จะมี tactile setae 2 เส้น เป็นเส้นยาวๆ ปลายมี bristle ขนาดเล็กๆ tactile setae นี้จะชี้ไปทางด้านท้ายทำหน้าที่สัมผัส

ท่อทางเดินอาหาร

ท่อทางเดินอาหารประกอบด้วย

Fore gut อยู่ต่อจากส่วนของปาก ส่วนนี้ค่อนข้างแข็งเนื่องจากบุด้วยพวกคิวติเคิล

Mid gut เป็นส่วนที่เริ่มโค้งขึ้นไปทางส่วนหัวและวกกลับลงมาทางส่วนนอก

บริเวณหัวจะมี caecum แยกออกมาจาก mid gut 1 คู่ ทำหน้าที่สร้างน้ำย่อย

Hind gut เป็นท่อทางเดินอาหารตอนท้ายซึ่งส่วนนี้จะแนบไปกับส่วนท้องที่พองขึ้น ปลายสุดจะเป็นทวารหนักเมื่อมีการขับส่วนท้อง ท่อทางเดินอาหารส่วนนี้ก็จะขับตามด้วย

อาหารของพวกไรแดงเป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยวขนาดเล็กๆ โปรโตซัว ยีสต์ แบคทีเรีย และอินทรีย์วัตถุเล็กๆ ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ ระวังคอกคู่ที่ 3,4 จะเป็นตัวพัดป้อนน้ำเข้ามาในเปลือกและกรองอาหารที่ปนเข้ามากับน้ำส่งเข้าสู่ส่วนปาก

ระบบหมุนเวียน

ระบบหมุนเวียนประกอบด้วยอวัยวะที่สำคัญคือ หัวใจ ซึ่งเป็นถุงยาวๆ อยู่ทางด้านหลังเหนือถุงพักไข่ มี ostia อยู่ทางด้านข้าง 1 คู่ มี aorta สั้นๆ นำเลือดออกจากหัวใจ หัวใจมีการเต้นเร็วมาก เมื่อหัวใจบีบตัวก็จะส่งเลือดไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งสามารถมองเห็นการเคลื่อนที่ blood corpuscle ได้อย่างชัดเจน ฮีโมโกลบินของไรแดงจะอยู่ในพลาสมา ไม่ได้อยู่ในเม็ดเลือด

ระบบประสาท

ประกอบไปด้วย cerebral ganglia อยู่ใต้ตา และมี optic nerve ส่งไปยังตา นอกจากนี้ยังมีกลุ่มเซลล์รับความรู้สึกเรียกว่า nuchal organ อยู่ใต้ caecum ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน เข้าใจว่ารับความรู้สึกเกี่ยวกับสารเคมี (chemoreceptor)

ระบบสืบพันธุ์

ไรแดงในสกุล Moina มีเพศแยก ตัวผู้มีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย แต่ตัวผู้พบน้อยมาก ดังนั้นส่วนใหญ่จึงพบแต่ตัวเมียและจะมีการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis

อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย

รังไข่ เป็นถุงยาวๆ 2 ถุงอยู่แนบกับลำไส้ส่วนกลาง มีท่อนำไข่สั้นๆ เปิดเข้าสู่ถุงพักไข่ (blood pouch) รังไข่จะแตกต่างจากลำไส้โดยจะเห็นเซลล์ไข่มีนิวเคลียสชัดเจน

Brood pouch เป็นถุงยาวๆ อยู่ในบริเวณช่องว่างระหว่างลำตัวกับคาราเพส เมื่อไข่เจริญเต็มที่แล้วก็จะเข้ามาอยู่ในถุงนี้ ไข่จะเจริญจนกระทั่งมีอวัยวะต่างๆ ครบถ้วนแล้วจึงจะหลุดออกไปทางด้านท้าย ถุงนี้ในบางชนิดจะมี thoracic spine คอยกั้นเอาไว้ไม่ให้หลุดออกจากตัว ในไรบางชนิดเช่น *Daphnia* ซึ่งอาศัยอยู่ในเขตหนาวจะสร้างไข่ที่มีเปลือกหนา มี yolk มาก ไข่ประเภทนี้

ต้องการการผสมจากสเปิร์มภายในถุงฟักไข่ตัวเอง เมื่อมีไข่ชนิดนี้ในถุงฟักไข่มันจะมีการผสมสารต่าง ๆ เพื่อทำให้เกิดความแข็งแรงของผนังถุงฟักไข่ ทำให้มีลักษณะเป็นกล่องแข็งๆ เรียกว่า ephippium เมื่อมีการลอกคราบ ephippium ก็จะหลุดออกมาอยู่ในน้ำและเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะฟักออกมาเป็นตัวต่อไป

อวัยวะสืบพันธุ์ของตัวผู้

มีอวัยวะอยู่บริเวณเดียวกับรังไข่ แต่จะมีท่อเปิดออกนอกตัวบริเวณปลายของส่วนท้อง

วงจรชีวิต

ไรแดงมีวงจรชีวิตสั้นมาก ไข่ที่เจริญโดย parthenogenesis เมื่อเข้าไปอยู่ในถุงฟักแล้วประมาณ 3 วัน ก็จะเจริญเป็นตัวอ่อนที่มีอวัยวะต่างๆ ครบถ้วนแล้ว และก็จะหลุดออกมาจากตัวแม่หากินได้ทันที จึงถือว่าไข่เจริญมาเป็นตัวเต็มวัยได้โดยตรงหรือไม่มี larva stage ลูกไรที่หลุดออกจากตัวแม่นี้ประมาณ 2 วัน ก็สามารถสร้างไข่ได้ ไรแดงสกุล *Moina* จะวางไข่ได้ 3-4 ครั้ง ครั้งที่ 1 และ 2 จะมีไข่จำนวนน้อยกว่าครั้งที่ 3 และ 4 (บพิธ จารุพันธุ์, 2529 : 50-53)

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Gammaridae เช่น แอมฟิพอด

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Crustacea
	Order	Amphipoda
	Family	Gammaridae
	Genus	Gammarus
	Scientific name	<i>Gammarus</i> sp.
	Common name	Gammarus
	Thai common name	แอมฟิพอด

Gammarus หรือแอมฟิพอด มีลักษณะตัวแบนโค้งงอเหมือนกุ้ง แต่ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนหัวของกุ้ง ขนาดทั่วไปยาวประมาณ 1-2 เซนติเมตร เท่านั้น อาศัยอยู่ในน้ำจืดหรือน้ำกร่อย โดยอยู่ตามหน้าดิน

ลักษณะภายนอก

ลำตัวแบ่งออกเป็นส่วนหัว ออก และส่วนท้อง ส่วนอกและส่วนท้องมีลักษณะคล้ายกันมาก แยกจากกันไม่เด่นชัดนักต้องสังเกตจากระยางค์

ส่วนหัว มีขนาดเล็ก ตาไม่มีก้านตา antennule และ antenna เป็นแบบ uniramous ส่วนอก ประกอบไปด้วยปล้อง 8 ปล้อง มีระยางค์ทั้งหมด 8 คู่ คือ

ระยางค์ออกคู่ที่ 1 ดัดแปลงไปเป็น maxilliped

ระยางค์อกคู่ที่ 2, 3 มีขนาดใหญ่ ข้อสุดท้ายเป็นกระเปาะและโค้งงอเป็นตะขอเป็นแบบ subchela

ระยางค์อกคู่ที่ 4-5 เป็นขาเดินธรรมดา ใช้ในการว่ายน้ำ

ระยางค์อกคู่ที่ 6, 7, 8 มีความยาวกว่าคู่อื่นๆ ใช้ในการยึดเกาะ

exopodite ของขาเดินจะมี epipodite ยื่นออกมาทำหน้าที่เหมือนกับเหงือก นอกจากนี้ในตัวเมีย exopodite ของระยางค์อกคู่ที่ 3, 4, 5 จะดัดแปลงเป็นถุงฟักไข่ (oostegite) เปลือกด้านข้าง (pleural) บริเวณอกจะยืดยาวเป็นพิเศษ หุ้มเอาระยางค์อกเอาไว้ ส่วนท้อง ส่วนท้องมี 6 ปล้อง ระยางค์ท้องทั้ง 6 คู่มีขนาดเล็ก แบ่งออกเป็น 2 ชุดคือ

ชุดแรก เป็นระยางค์ท้อง 3 คู่แรก ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำและพัดโบกน้ำไปยังโคนขาเดินเพื่อแลกเปลี่ยนแก๊ส

ชุดที่สอง เป็นระยางค์ท้อง 3 คู่หลัง (รวมทั้ง uropod) ทำหน้าที่ยันพื้นทีเวลาจะกระโดดทั้ง 3 คู่นี้จะชี้ไปทางด้านท้ายของลำตัว

การกินอาหาร

เป็นพวก scavenger กินเศษวัตถุเน่าเปื่อย (detritus) เป็นอาหารโดยใช้ gnathopod ช่วยจับอาหารเข้าสู่ปาก ท่อทางเดินอาหารเป็นวงสั้นๆ มี caecum บริเวณส่วนท้ายของ mid gut

การสืบพันธุ์

มี gonad เป็นท่อคู่ ตัวผู้จะมีช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ที่อกปล้องสุดท้าย ตัวเมียมีท่อนำไข่ไปเปิดที่บริเวณ coxa ของระยางค์อกคู่ที่ 6 การผสมพันธุ์มีการจับคู่กันโดยมี coax pheromone จากตัวเมียเป็นสารชักนำ ตัวผู้จะเข้ามารัดตัวเมียและส่งสเปิร์มเข้าไปใน oostegite การผสมเกิดขึ้นภายใน oostegite ซึ่งตามขอบจะมีขนเส้นเล็กๆ จำนวนมากช่วยกันไข่ไม่ให้หลุดออกไป (บพิธ จารุพันธุ์, 2529 : 77-78)

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Agrionidae เช่น ตัวอ่อนแมลงปอเขม

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Insecta
	Order	Odonata
	Family	Agrionidae
	Genus	Ischnura
	Scientific name	<i>Ischnura</i> sp.
	Common name	Damselfly
	Thai common name	ตัวอ่อนแมลงปอเขม

Order Odonata: ตัวอย่างแมลงในอันดับนี้ ได้แก่แมลงปอ (Dragonflies) และแมลงปอเข็ม (Damselflies)

ลักษณะทั่วไป

เป็นแมลงที่มีขนาดปานกลางจนถึงขนาดใหญ่ มีสีสดสวยต่าง ๆ กันชอบบินอยู่ในอากาศ ตัวแก่มีปีกเป็นแผ่นบาง ๆ 2 คู่ ปีกคู่หน้าและคู่หลังมีการเรียงตัวของเส้นปีกคล้ายคลึงกัน มีขาเจริญดี หนวดแบบ seraceous ปากแบบกัด ตาประกอบขนาดใหญ่ ส่วนอกมีขนาดเล็ก ปล้องอกเรียงกันอัดแน่น โดยที่ prothorax มีขนาดเล็กกว่า mesothorax และ metathorax ด้านหลังของ pterothorax ซึ่งอยู่ระหว่าง pronotum และฐานปีกจะมี pleural suture ด้วยส่วนท้องยาวเรียว มี cercus ปล้องเดียว และใช้ทำหน้าที่ในการจับตัวเมีย มี Simple Metamorphosis

ในพวกแมลงปอ (Dragonflies) ตัวเมียและตัวผู้มักมีสีเหมือนกัน แต่ตัวผู้มีสีสดใสกว่า บางชนิดสีที่ปีกของตัวผู้และตัวเมียจะแตกต่างกัน พวกแมลงปอเข็ม (Damselflies) ตัวเมียมักมีสีต่าง ๆ กันในขณะเจริญเติบโต เช่นมีสีส้มในระยะเป็นตัวแก่ใหม่ๆ พอเจริญเต็มที่มีสีน้ำเงินเป็นต้น ตัวผู้มีสีสดใสและต่างไปจากตัวเมีย เวลาบินปีกคู่หน้าและหลังบินสลับกัน ปีกคู่หลังขยับปีกต่ำกว่าปีกคู่หน้า กล้ามเนื้อที่ช่วยในการบินมีลักษณะต่างไปจากแมลงอื่น โดยมีกล้ามเนื้อยึดระหว่าง notum กับ Sternum เมื่อหดตัว notum โค้งลงปีกจะยกขึ้น และมีกล้ามเนื้อด้านข้างยึดติดกับฐานของปีกทำหน้าที่ในการตีปีกให้ลดลง (แมลงอื่นๆมีกล้ามเนื้อตามแนวยาว)

วงชีวิต

แมลงปอเข็มตัวแก่มีอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ พวกแมลงปอตัวแก่มีอายุนาน 6-8 สัปดาห์ ทั้ง 2 พวกผลิตลูกหลานปีละครั้ง ทั้งแมลงปอและแมลงปอเข็มเป็นแมลงที่มีลักษณะอวัยวะเพศของตัวผู้ต่างไปจากแมลงทั่วไป แมลงปอตัวผู้มีอวัยวะช่วยในการผสมพันธุ์ (copulatory organs) อยู่ตรงด้านล่างของปล้องท้องที่ 2 ส่วนแมลงทั่วไป อวัยวะนี้อยู่ที่ส่วนท้ายของท้อง ก่อนผสมพันธุ์แมลงตัวผู้จะนำอสุจิจากรูเปิดที่ช่องท้องปล้องที่ 9 มาเก็บไว้ที่ปล้องที่ 2 การถ่ายอสุจินี้ใช้วิธีโค้งส่วนท้ายของท้องลงทางด้านล่าง และยื่นไปข้างหน้า อสุจิซึ่งเก็บอยู่ในถุงเล็กๆ จะถูกนำไปวางไว้ที่ช่องท้องปล้องที่ 2 จากนั้นจะบินหาตัวเมีย เมื่อพบแมลงตัวเมียตัวผู้จะบินเหนือสูงกว่าใช้ cercus จับที่ด้านข้างของหัวหรือ prothorax แล้วพากันบินเป็นคู่ ต่อมาตัวเมียจะโค้งส่วนท้องมารับอสุจิที่ปล้องที่ 2 ของตัวผู้ หลังจากผสมพันธุ์แล้วตัวเมียจะบินไปวางไข่ โดยแมลงปอบางชนิดตัวเมียวางไข่ในขณะที่ยังไม่แยกจากตัวผู้ บางชนิดตัวผู้แยกบินหนีไปปล่อยให้ตัวเมียวางไข่ตามลำพัง และบางชนิดตัวผู้จะบินตามตัวเมียในขณะที่เริ่มวางไข่ เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงตัวผู้อื่นๆมาจับตัวเมียไปผสมพันธุ์ซ้ำอีก มีบ่อยครั้งที่ตัวเมื่อกำลังบินหาที่วางไข่ถูกแมลงตัวผู้จับไปผสมพันธุ์ซ้ำอีกครั้ง การวางไข่ของแมลงปอและแมลงปอเขมนั้นแตกต่างกันไปแมลงปอที่ไม่มี ovipositor ตัวเมียจะบินเหนือผิวน้ำใช้ส่วนท้ายของท้องจุ่มลงในน้ำ แล้วปล่อยไข่ลงไป ตัวเมียเหล่านี้จะบินมาวางไข่ตามลำพัง ไม่มีตัวผู้บินมาเป็นเพื่อน พวกที่มี ovipositor แต่ไม่ค่อยเจริญดีนักจะบินไปตามแหล่งน้ำตื้นๆ จุ่มส่วนท้ายของท้องลงในน้ำ ปล่อยไข่ลงสู่ด้านล่างของแหล่งน้ำ ส่วนพวกที่มี ovipositor เจริญดี ตัวเมียจะบินมา

วางไข่ในขณะที่ยังมีตัวผู้จับเกาะอยู่หรือหลังจากตัวผู้แยกไปแล้ว ตัวเมียใช้ ovipositor แทงลงในเนื้อเยื่อของพืชน้ำตรงบริเวณใต้ผิวน้ำ หรือเหนือผิวน้ำ แล้วสอดไข่ลงในเนื้อเยื่อพืชตัวเมียบางชนิดจะไปตามต้นพืชในน้ำ และสอดไข่ไว้ในเนื้อเยื่อ ตรงบริเวณที่ต่ำกว่าผิวน้ำเกือบหนึ่งฟุต ไข่จะฟักตัวภายในเวลา 1-3 สัปดาห์

ตัวอ่อน เรียก nymphs หรือ naiads อาศัยอยู่ในน้ำ หายใจด้วยเหงือก ตัวอ่อนแมลงปอเข็มมีเหงือกรูปร่างใบไม้ จำนวน 3 อัน อยู่ตรงส่วนท้ายของท้อง การเคลื่อนที่อาศัยการโบกแกว่งตัวคล้ายปลา ใช้เหงือกโบกพ่นน้ำคล้ายหางของปลา ตัวอ่อนแมลงปอ มีเหงือกเป็นสันอยู่ภายใน rectum ในขณะที่หายใจจะเคลื่อนผ่านทวารหนักสู่ rectum และน้ำเคลื่อนที่ผ่าน rectum ออกสู่ทวารหนักขณะแมลงหายใจออก บางครั้งถ้าแมลงตกใจหรือถูกรบกวนจะพ่นน้ำผ่าน rectum อย่างรวดเร็วทำให้แมลงเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเร็วกว่าปกติ การเคลื่อนที่แบบนี้คล้ายการเคลื่อนที่ของเครื่องบินไอพ่น ตัวอ่อนปกติอาศัยอยู่ตามต้นไม้ในน้ำ ตามก้นบ่อ-สระ หรือฝังตัวอยู่ในโคลนตม มี labium ทำหน้าที่ในการจับเหยื่อ เมื่อไม่ใช้ labium จะงอเก็บไว้ได้หัว เวลาจับเหยื่อ labium จะพุ่งออกจากใต้หัวอย่างรวดเร็ว และใช้พู่เล็กๆ 2 พู่ที่อยู่ปลายของ labium จับเหยื่อ พู่นี้เชื่อว่าเปลี่ยนแปลงมาจาก palp นั่นเอง ปกติ labium ในขณะยื่นออกมาส่วนหัวมีความยาวเกือบ 3 เท่าของลำตัว ตัวอ่อนเจริญเป็นตัวแก่ใช้เวลาต่าง ๆ กัน บางชนิดใช้เวลาภายในปีเดียว บางชนิดใช้เวลา 2-4 ปี ตัวอ่อนที่เจริญเต็มที่จะคลานขึ้นมาอยู่บนต้นไม้หรือก้นหินตามชายฝั่ง ลอกคราบครั้งสุดท้ายเป็นตัวแก่ มีลำตัวสีจางซีด อ่อนนุ่ม และไม่สามารถบินได้เรียก teneral ต่อมาอีก 2-3 วัน ลำตัวเริ่มแข็งแรงมีสีสดใสและเริ่มบินได้อย่างรวดเร็ว

ที่อยู่อาศัย

แมลงปอตัวแก่ส่วนมากบินอยู่ในอากาศ ตามทุ่งนา ทุ่งหญ้าที่มีแหล่งน้ำอยู่ใกล้ๆ บางครั้งเกาะอยู่ตามต้นพืชในแหล่งน้ำ หรือเกาะอยู่ตามเสารั้วบ้าน ตัวอ่อนอาศัยอยู่ในน้ำ เช่น สระ หนอง บึง ลำธาร เป็นต้น

อาหาร

ตัวแก่กินแมลงเล็กๆ ที่บินอยู่ในอากาศ การจับและกินอาหารทำในขณะที่กำลังบินอยู่ในอากาศโดยใช้ขาคู่หน้าประกบติดกันคล้ายตะกร้าจับเหยื่อ เหยื่อส่วนมากเป็น ยุง ริ้น ด้วเสื่อกลาง คีรีขนาดเล็กๆ บางครั้งก็กินพวกผึ้ง ด้วเสื่อ และแมลงปอ ตัวอ่อนซึ่งอาศัยอยู่ในน้ำกินแมลงและตัวอ่อนของแมลงเป็นอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นเหยื่อพวกลูกกบ ลูกคางคก ลูกปลา และกุ้ง (ไพฑูรย์ สุขศิริงาม; 2521 : 80-83)

แมลงปอเข็ม (Damselflies) ป็นแมลงที่มีรูปร่างเรียวกว่าแมลงปอ บินไม่ค่อยเร็วส่วนอก โดยเฉพาะ Metathorax ขู่ขึ้นคล้ายรูปสามเหลี่ยมและเอียงไปทางด้านหลังทำมุม 70-80 องศากับแกนความยาวของลำตัว ปีกคู่หน้าและคู่หลังมีรูปร่างคล้ายคลึงกัน โคนปีกมีขนาดเล็กกว่าปลาย ปีกเวลาพักปีกจะหุบติดกันชูเหนือลำตัว และมักวางขนานกับแกนความยาวของลำตัว ตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะรูปร่างของปีกเหมือนกันปกติหัวของแมลงปอเข็มค่อนข้างยาวตามขวางไม่กลมตัวผู้

มีระยางค์ที่ส่วนท้ายของท้อง 4 อัน 2 อันด้านบนเป็น Cercus อีก 2 อันด้านล่างเป็น Paraproct ตัวเมียมี Ovipositor จึงทำให้ส่วนท้ายสุดของตัวเมียพองกว่าปกติ ตัวอ่อนมีเหงือกรูปใบไม้ 3 อันอยู่ที่ส่วนท้ายของท้อง และมักเกาะอยู่บนต้นพืชมากกว่าอยู่ตามพื้นล่างของแหล่งน้ำ (ไพฑูรย์ สุขศรีงาม. 2521 : 85)

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Chironomidae เช่น หนอนแดง

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Insecta
	Order	Diptera
	Family	Chironomidae
	Genus	Chironomus
	Scientific name	<i>Chironomus</i> sp.
	Common name	Midge
	Thai common name	หนอนแดง รันน้ำจืด

หนอนแดง เป็นตัวอ่อนของแมลงชนิดหนึ่ง ชาวบ้านเรียกว่า รันน้ำจืด (midge) ลักษณะของ รันน้ำจืดมีรูปร่างคล้ายยุงตัวผู้มีหนวดงามแบบพุ่มขนนก (plumose) ส่วนหัวเล็กขอบหดเข้าไปอยู่ในส่วนอก ตัวยาว ประมาณ 8-10 มิลลิเมตร มักอยู่เป็นฝูงใกล้ผิวน้ำและใกล้แสงสว่าง ตัวเมียชอบวางไข่ในน้ำที่ลมสงบเฉลี่ยตัวละ 2,300 ฟอง ไข่จะฟักเป็นตัวหนอนภายในเวลา 3-4 วัน ตัวหนอนจะมีสีแดงจึงเรียกว่า หนอนแดง ลำตัวยาว ประมาณ 3-18 มิลลิเมตร หัวส่วนแบ่งแยกจากลำตัวเห็นได้ชัด มีตาเป็นจุดสีดำเล็กๆ 1 คู่ มีขนเล็กๆ สำหรับกวาดอาหารเข้าสู่ปาก มีฟันและกรามที่แข็งแรง อาหารของหนอนแดงคือ อินทรีย์วัตถุที่เน่าสลาย (detritus) ส่วนอกจะขยายใหญ่มีอวัยวะหายใจยื่นยาวออกมาเป็นท่อเล็กๆ 1 คู่ บางชนิด (species) จะมีลักษณะเป็นสายยาว ลำตัวแบ่งเป็น 12 ปล้อง 3 ปล้องแรกรวมกันเรียกว่า cephalothorax ตัวอ่อนเมื่ออายุได้ 10-12 วัน จะสร้างปลอก (tube) หุ้มตัวโดยใช้โคลนและเศษอินทรีย์วัตถุที่ย่อยสลายในน้ำ ปลอกนี้จะช่วยยึดส่วนอก และขาเทียม 2 คู่ ที่อยู่บริเวณท้อง ช่วยขึงลำตัวและป้องกันไม่ให้กระแสน้ำผ่านเข้าออก และเป็นทางรับปริมาณออกซิเจนหนอนแดงจะอาศัยอยู่ในปลอกนี้นาน 6-8 วัน ระยะนี้เรียกว่า ระยะก่อนเข้าดักแด้ (prepupa) เมื่อครบกำหนดหนอนแดงจะสลัดปลอกทิ้งเข้าสู่ระยะดักแด้ (pupa) ซึ่งมีลักษณะคล้ายลูกน้ำยุง เรียกว่า ไ้ไม่ม่ง แต่มีสีแดงคล้ำ ระยะนี้ 1-2 วัน โดยจะลอยตัวในแนวตั้งตั้งฉากกับผิวน้ำ หลังจากนั้นจึงลอกคราบเปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย เรียกว่า รันน้ำจืด วงจรชีวิตของแมลงชนิดนี้ประมาณ 21-28 วัน รันน้ำจืดในประเทศร้อนจะมีวงจรชีวิตสั้นกว่ารันน้ำจืดในประเทศแถบหนาว หนอนแดงมีความสำคัญต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ใช้เป็นอาหารลูกกุ้งวัยอ่อน เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (จำนง ธีรวิทย์. 2546 : ออนไลน์)

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Limulidae เช่น แมงดาหางกลม (แมงดาถ้วย แมงดาไฟ เหรา)

จัดอยู่ใน	Phylum	Arthropoda
	Class	Merostomata
	Order	Xiphosura
	Family	Limulidae
	Genus	Carcinoscorpius
	Scientific name	<i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>
	Common name	Horseshoe Crab
	Thai common name	แมงดาหางกลม แมงดาถ้วย

ลักษณะภายนอก

ลำตัวแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ prosoma และ opisthosoma

Prosoma มีลักษณะเป็นแผ่นโค้งกว้างด้านหลังนูน ด้านท้องเว้า ส่วนนี้อาจเรียกว่าเป็นคาราเพลส ซึ่งคลุมส่วนอกและส่วนหัวเอาไว้ ผิวด้านบนของคาราเพลส จะมีขนแข็งๆ สีส้มติดอยู่บริเวณกลางๆและด้านหน้า ขนนี้พบในพวกแมงดาถ้วยเท่านั้น ด้านข้างของคาราเพลสมี lateral eye 1 คู่ ตานี้มีลักษณะเป็นตารวมประกอบไปด้วยตาย่อย (ommatidium) 8-14 อันแต่ตาย่อยนี้ไม่สมบูรณ์ทุกอัน มีเพียงบางอันเท่านั้นที่มองเห็นภาพได้ ด้านหน้าของ prosoma มี median eye อยู่ 3 คู่มีขนาดเล็กมาก ตาประเภทนี้ในระยะตัวอ่อนเจริญดีและมีขนาดใหญ่ในตัวผู้ชอบด้านหน้าของ prosoma ทางด้านท้องจะเว้าเป็นแอ่งลงไป ส่วนในตัวเมียจะเรียบระยางค์บน prosoma มี 6 คู่คือ

Chelicera เป็นระยางค์คู่แรกมีขนาดเล็กประกอบไปด้วยปล้อง 2 ปล้องปลายเป็นก้ามหนีบ

Pedipalp เป็นระยางค์คู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่กว่าคู่แรก ปลายเป็นก้ามหนีบในตัวผู้ข้อสุดท้ายจะโป่งเป็นกระเปาะและปลายเป็นหนามแหลม โคนของ pedipalp เป็นแผงขนเรียกว่า gnathobase

Walking leg มี 4 คู่ แต่ละอันประกอบด้วย 6 ข้อ ส่วน coxa ของขาเดินจะเป็นแผงขนเรียกว่า gnathobase เช่นเดียวกับ pedipalp ในเพศผู้ขาเดินคู่แรกข้อสุดท้ายเป็นกระเปาะและมีหนามแหลมเหมือน pedipalp ขาเดินคู่สุดท้ายบริเวณ coxa จะเป็นแผ่นแบนโค้งขนาดใหญ่ และมีติ่ง (epipodite) เรียกว่า spathulate coxa process (flabellum) ทำหน้าที่ทำความสะอาดแผ่นเหงือก นอกจากนี้ข้อสุดท้ายของขาเดินคู่สุดท้ายจะมีหนาม 4 อันติดอยู่ที่โคนข้อสุดท้ายมีลักษณะเป็นแผ่นแบนขอบงอเข้าหากันเหมือนช้อนเรียกว่า tarsal spathula ทำหน้าที่ขูดพื้นโคลน ขาเดินคู่สุดท้ายไม่มี gnathobase ตรงรอยต่อระหว่าง prosoma กับ opisthosoma จะมีระยางค์อยู่ 1 คู่อยู่ติดกัน มีขนาดเล็กเป็นติ่งเล็กๆเรียกว่า chilaria ระยางค์นี้ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน ระยางค์นี้ติดอยู่บนปล้องที่เรียกว่า pregenital segment ซึ่งปล้องนี้เจริญดีในตัวอ่อน แต่เมื่อเป็นตัวเต็มวัยปล้องหายไปเหลือแต่ระยางค์

Opisthosoma เป็นส่วนที่ติดกับ prosoma โดยมีบานพับยึดเอาไว้ ส่วนนี้สามารถขยับขึ้นลง ช่วยในการว่ายน้ำได้ดี ขอบทางด้านข้างมี movable spine ข้างละ 6 อัน (ในแมงดาจานหนามจะ ยาวกว่าหนามของแมงดาถ้วย) ปลายสุดของส่วนนี้เป็นส่วนหางซึ่งยาวและแข็งแรง ส่วนหางนี้ไม่ได้ ทำหน้าที่ในการว่ายน้ำ แต่จะช่วยยันพื้นเวลาแมงดาทะเลจะพลิกตัวกลับเมื่อเวลามันหงายท้องอยู่ หางของแมงดาจานมีหนามเล็กอยู่บนสัน ระบายที่พบในส่วนนี้มี 6 คู่คือ genital operculum เป็น แผ่นแบนขนาดใหญ่ปิดระบายอื่น ๆ ไว้เกือบหมดช่อง genital pore อยู่ใต้ระบายคู่นี้ เหนือก็มี 5 คู่ เรียงซ้อนกันอยู่ มีลักษณะเป็น biramous ส่วนของ endopodite เล็กและแคบอยู่ตรงกลางตัว ส่วน ของ exopodite เป็นแผ่นขนาดใหญ่ด้านท้องมี branchial leaflet ซ้อนกันจำนวนมากทำหน้าที่ใน การแลกเปลี่ยนแก๊ส

การกินอาหารและท่อทางเดินอาหาร

แมงดาทะเลเป็นพวก scavenger กินพวกตัวหนอนและสาหร่ายบางชนิดเป็นอาหารโดยใช้ ก้ามหนีบของ chelicera หรือ pedipalp จับอาหาร อาหารจะผ่านเข้าสู่ร่องระหว่าง gnathobase ทั้ง สองข้างเข้าสู่ปาก ท่อทางเดินอาหารประกอบไปด้วย

หลอดอาหาร เป็นท่อสั้นๆอยู่ต่อจากปาก

Crop เป็นกระเปาะมีกล้ามเนื้อแข็งแรงทำหน้าที่บดอาหาร ปลายสุดของ crop มีลิ้นปิดเปิด เพื่อปล่อยอาหารไปยังกระเพาะ

กระเพาะ อยู่ต่อจาก crop เป็นส่วนที่ทอดยาวไปทางด้านท้าย มีท่อจากต่อมน้ำลายมาเปิด เข้าข้างละ 1 คู่

ลำไส้ เป็นท่อแคบกว่ากระเพาะอาหารอยู่ทางด้านท้อง (opisthosoma) ปลายสุดเปิดออกที่ โคนหาง

ระบบหมุนเวียน

แมงดาทะเลมีระบบหมุนเวียนเจริญดี ประกอบไปด้วย tubular heart เป็นท่อบางๆ อยู่เหนือ ท่อทางเดินอาหารมี ostia อยู่ 8 ช่อง เลือดจากหัวใจจะส่งไปยังเส้นเลือดใหญ่ทางด้านหน้า 3 เส้น ด้านข้าง 4 เส้น ไปยังอวัยวะต่างๆ เลือดเสียจากอวัยวะต่างๆ จะมารวมกันที่ ventral sinus และส่ง ต่อไปยังเหงือกเพื่อรับออกซิเจนและกลับเข้าสู่หัวใจ การเคลื่อนไหวของแผ่นเหงือกช่วยในการ หมุนเวียนโลหิตได้ดี เลือดแมงดาทะเลมี haemocyanin

การสืบพันธุ์

แมงดาทะเลมีเพศแยก ตัวผู้มีขนาดเล็กกว่าตัวเมียเล็กน้อย และข้อปลายสุดของ pedipalp กับขาเดินคู่แรกเป็นกระเปาะ ปลายกระเปาะเป็นหนามแหลม รังไข่ของแมงดาทะเลมีลักษณะเป็น ท่อและสานกันเป็นตาข่าย gonad อยู่ทางด้านท้ายของ prosoma และมีท่อมาเปิดออกที่ genital pore ตัวเมียที่โตเต็มที่แล้วจะมีไข่อยู่บริเวณด้านหน้าสุดของ prosoma การผสมพันธุ์มีการจับคู่และ ผสมภายนอก ตัวเมียจะผสมไข่ที่ผสมแล้วไว้ตามพื้นโคลนตื้นๆไข่ของแมงดาจานมีขนาดโตกว่าไข่ ของแมงดาถ้วย (บพิธ จารุพันธุ์. 2529 : 112-114)

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Muricidae เช่น หอยมะระ

จัดอยู่ใน	Phylum	Mollusca
	Class	Gastropoda
	Order	Mericaea
	Family	Muricidae
	Genus	Thais
	Scientific name	<i>Thais</i> sp.
	Common name	-
	Thai common name	หอยมะระ

ลักษณะทั่วไปของหอยในวงศ์ Muricidae

เปลือกมีขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ โดยทั่วไปมักจะหนาและแข็ง รูปร่างเปลือกเป็นรูปกระสวย เนื่องจากเปลือกด้านหน้ามีร่องไซฟอน (siphon) ยาว ขอบปากเปลือกอาจเรียบหรือเป็นหยักและมีรูปร่างกลม บอดี้เวิร์ล (body whorl) ใหญ่ ผิวเปลือกขรุขระเต็มไปด้วยดุมหรือหนามแหลมยาว โอเพอร์คิวลัม (operculum) เป็นมันเงาและหนา พบในน้ำเค็ม ชอบอยู่บริเวณน้ำตื้นระหว่างโขดหิน หรือฝังตัวอยู่ในพื้นโคลนและพื้นทราย หรืออาจอยู่ใต้ก้อนหินหรือบนปะการัง ชอบกินสัตว์อื่นเป็นอาหาร บางชนิดเป็นศัตรูสำคัญของหอยนางรม หอยที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Murex* Linnaeus, *Rapana* Schumacher, *Mancinella* Link, *Chicoreus* Montfort, *Thai* Roding, *Muricopsis* Bacquoy Dautzenberg & Dollfuss, *Naquetia* Jousseaume, *Pterpynotus* Swainson, *Purpura* Bruguiere, *Nassa* Roding, *Drupa* Roding, *Drupella* Thiele และ *Morula* Schumacher (สุชาติ อุปถัมภ์ และคนอื่นๆ. 2538 : 149)

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Thiaridae

ได้แก่ หอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*) และหอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*)

ลักษณะทั่วไปของหอยในวงศ์ Thiaridae

เปลือกทรงกรวยยาวหรืออาจเป็นทรงกรวยรูปไข่ ผิวเปลือกไม่เรียบอาจเป็นสันหรือลวดลายนูนหรือขรุขระ สไปร์ (spire) มักจะสีกร่อน โอเพอร์คิวลัมบาง เป็นมัน และเป็นแบบพอสไปรัล (paucispiral) หรือมัลติสไปรัล (multispiral) หอยเพศเมียออกลูกเป็นตัว ฝังตัวอ่อนจะอยู่ใต้ช่องลำตัวบริเวณคอและรูเปิดทางด้านขวาของคอ พบในทวีปยุโรปตอนใต้ แอฟริกา เอเชีย อเมริกาใต้ ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำจืด หอยที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Brotia* Adams, *Paracrostoma* Cossmann, *Thiara* Roding, *Melanoides* Olivie, *Tarebia* Adams, *Sermyla* Adams (สุชาติ อุปถัมภ์ และคนอื่นๆ. 2538 : 142)

หอยเจดีย์ 1 (*Melanoides tuberculata*)

จัดอยู่ใน	Phylum	Mollusca
	Class	Gastropoda
	Order	Cerithiacea
	Family	Thiaridae
	Genus	Melanoides
	Scientific name	<i>Melanoides tuberculata</i>
	Common name	-
	Thai common name	หอยเจดีย์ 1

หอยเจดีย์ 2 (*Sermyla riqueti*)

จัดอยู่ใน	Phylum	Mollusca
	Class	Gastropoda
	Order	Cerithiacea
	Family	Thiaridae
	Genus	Sermyla
	Scientific name	<i>Sermyla riqueti</i>
	Common name	-
	Thai common name	หอยเจดีย์ 2

ชนิดสัตว์ในวงศ์ Lumbriculidae เช่น ไส้เดือนแดง

จัดอยู่ใน	Phylum	Annelida
	Class	Oligochaeta
	Order	Lumbriculida
	Family	Lumbriculidae
	Genus	Lumbriculus
	Scientific name	<i>Lumbriculus vareigatus</i>
	Common name	Black worm
	Thai common name	ไส้เดือนแดง ไส้เดือนน้ำ

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาววิลาวัลย์ รักษาธรรม
วันเดือนปีเกิด	16 เมษายน 2518
สถานที่เกิด	อำเภอสุวรรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 33 หมู่ 11 บ้านดอนตู ตำบลหัวช้าง อำเภอสุวรรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด 45130
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	ครู อันดับ ค.ศ.1
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนบ่อพันขันวิทยา ตำบลจำปาขัน อำเภอสุวรรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด 45130
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2537	มัธยมศึกษาปีที่ 6 (สายวิทย์ - คณิต) จากโรงเรียนร้อยเอ็ดวิทยาลัย จังหวัดร้อยเอ็ด
พ.ศ. 2541	ค.บ.(วิทยาศาสตร์ทั่วไป) จากสถาบันราชภัฏ สวนสุนันทา จังหวัดกรุงเทพฯ
พ.ศ. 2548	กศ.ม. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทร วิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ