

การตรวจสอบการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium*

ปริญญานิพนธ์

ของ

สุดา ชูถิ่น

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม 2547

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การตรวจสอบการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium*

บทคัดย่อ
ของ
สุดา ชูถิ่น

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ

พฤษภาคม 2547

สุดา ชูถิ่น. (2546). การตรวจสอบการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล

Macrobrachium. ปรินูญานิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : รองศาสตราจารย์ ดร.วีระ-
วรรณ สิทธิกรกุล, รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล, อาจารย์ ดร. ศิวาพร
ลงยันต์.

จากการตรวจสอบการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium* ได้แก่ กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* กุ้งฝอย *M. lanchesteri* กุ้งกะต๋อม1 *M. sintangense* และ กุ้งกะต๋อม2 *M. equidens* นำตัวอย่างกุ้งมาทดลองศึกษาการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 3 แบบ การทดลองคือ การตรวจสอบการติดเชื้อในกุ้งจากธรรมชาติ การติดเชื้อโดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองแล้วเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 30 วัน และการติดเชื้อจากการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองนานติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 67 และ 22 กิโลดาลตัน และตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR ผลการตรวจสอบไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งจากธรรมชาติทุกชนิดจากการตรวจสอบทั้ง 2 วิธี การทดลองโดยการฉีดด้วยเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* ไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากการตรวจสอบทั้ง 2 วิธี ในทุกช่วงเวลาการทดลอง กุ้งฝอย *M. lanchesteri* พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ในวันที่ 3 (1/10, 3/20) จากการตรวจสอบทั้งวิธี immunohistochemistry และ RT-PCR กุ้งกะต๋อม1 *M. sintangense* พบการติดเชื้อในกุ้งทดลองหลังการฉีดเชื้อไวรัสวันที่ 3 (20/20) วันที่ 10 (20/20) และพบว่าการติดเชื้อลดลงหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 30 วัน (6/17) จากการตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry และ RT-PCR กุ้งกะต๋อม2 *M. equidens* พบการติดเชื้อหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในวันที่ 3 (7/13) และ 10 (1/12) จากการตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry ส่วนการทดลองโดยให้กุ้งตัวอย่างกินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อไวรัสแล้วตรวจสอบด้วยวิธีการติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry ในกุ้งฝอย *M. lanchesteri* พบการติดเชื้อในวันที่ 20 (4/20) และวันที่ 30 (2/20) กุ้งกะต๋อม1 *M. sintangense* พบการติดเชื้อในวันที่ 10 (4/20) 20 (1/20) และ 30 (2/20) กุ้งกะต๋อม2 *M. equidens* พบการติดเชื้อหลังการกิน 5 วัน (1/17) จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากุ้งในสกุล *Macrobrachium* บางชนิด เช่นกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* นั้นสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองได้ดี ส่วนกุ้งฝอย *M. lanchesteri* กุ้งกะต๋อม1 *M. sintangense* และกุ้งกะต๋อม2 *M. equidens* สามารถติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และมีความต้านทานต่อเชื้อได้ต่ำจึงอาจมีศักยภาพในการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองได้

DETECTION OF YELLOW HEAD VIRUS CARRIER IN
Macrobrachium

AN ABSTRACT
BY
SUDA CHOOTHIN

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakharinwirot University
May 2004

Suda Choothin. (2003). *Detection of yellow head virus carrier in Macrobrachium*.

Master thesis, M. Sc. (Biological Chemistry). Bangkok : Graduate School,
Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Dr. Weerawan
Sithigorngul, Assoc. Prof. Dr. Paisarn Sithigorngul, Dr. Siwaporn Longyant.

Detection of yellow head virus in four species of *Macrobrachium*: *Macrobrachium rosenbergii*, *Macrobrachium lanchesteri*, *Macrobrachium sintangense* and *Macrobrachium equidens* was performed by utilizing monoclonal antibodies specific to 135, 67, and 22 kDa proteins of yellow head virus (YHV) and RT-PCR. Three experimental methods were used to detect shrimp samples collected nearby *P. monodon* farming area: naturally collected samples, yellow head virus infected samples and YHV infected tissue-fed samples for 30 days. No infection was found in every naturally collected shrimp species. In YHV-infected *M. rosenbergii*, no sign of infection was observed by immunohistochemistry. In *M. lanchesteri*, the infection was found at day 3 (1/10, 3/20) after injection with YHV as detected by immunohistochemistry and RT-PCR methods. In YHV-injected *M. sintangense*, the infection was found at days 3 (20/20), 10 (20/20) and 30 (6/17) by immunohistochemistry and RT-PCR. In YHV-injected *M. equidens*, the infection was found at days 3 (7/13) and 10 (1/12) by immunohistochemistry method. For feeding experiment, The infection was found in *M. lanchesteri* at days 20 (4/20) and 30 (2/20) after feeding with YHV-infected tissues. In *M. sintangense* the infection was found at days 10 (4/10), 20 (1/20) and 30 (2/20) after feeding with YHV-infected tissues. In *M. equidens* the infection was found at day 5 (1/17) after feeding. These experiments indicated that some species of *Macrobrachium* especially *M. rosenbergii* can resist yellow head virus infection. However, in some species such as *M. lanchesteri*, *M. sintangense* and *M. equidens* can be infected with YHV and are able to tolerate the infection indicating their potentialities as yellow head virus carriers.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

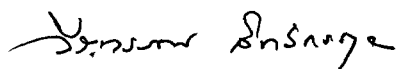
การตรวจสอบการเป็นพาหะของไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium*

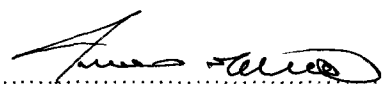
ของ
นางสาวสุดา ชูถิ่น

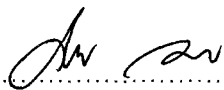
ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

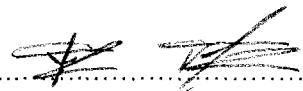
.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.นภาพร หะวานนท์)
วันที่ ๙ พฤษภาคม พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

 ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล)

 กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

 กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(อาจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำเป็นอย่างดีจาก
รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล รองศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และ
อาจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบ
และกรุณาตรวจสอบแก้ไขปริญญานิพนธ์

ขอบคุณโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการ
อาหาร สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ให้โอกาสและเวลาในการศึกษาครั้งนี้

ขอบคุณสถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาที่สนับสนุนทุนการศึกษา

ขอบคุณ คุณสมบัติ รักประทานพร คุณจรัสพร ตั้งขบวนบุตร คุณदनัย พึ่งขจร
คุณณัฐชัย อุ่นใจ อาจารย์ธิดา อมร อาจารย์วรพันธ์ บุญชัย และอาจารย์ศิริพร ทิพย์สิงห์ ที่ให้
คำแนะนำช่วยเหลือในระหว่างการทำวิจัย

ขอรำลึกถึงพระคุณบิดา คุณย่า และคุณตา (ผู้ล่วงลับ) มารดา น้องสาว และน้องชาย
ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่เกี่ยวข้องและสนับสนุนการศึกษาและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดย
ตลอดจนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดา ชูถิ่น

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
สมมติฐานของการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
เชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง.....	6
ชนิดและลักษณะของกุ้งในสกุล <i>Macrobrachium</i>	7
การศึกษาเกี่ยวข้องกับไวรัสโรคหัวเหลือง.....	13
การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง.....	20
พาหะของโรคไวรัสหัวเหลือง.....	24
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
สัตว์ทดลอง.....	29
อุปกรณ์และสารเคมี.....	29
วิธีดำเนินการทดลอง.....	31
การเก็บตัวอย่างกุ้ง.....	31
การพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้ง.....	31

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ) การทดลอง.....	32
การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology.....	32
กระบวนการย้อมโดยวิธีอินไดเรคติมมูโนเปอร์ออกซิเดส.....	34
การตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธี RT-PCR.....	38
การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	41
4 ผลการวิจัย.....	46
การพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้งสกุล <i>Macrobrachium</i>	46
การทดลองเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบการเป็นพาหะ.....	49
การทดลองเพื่อตรวจสอบการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ในเนื้อเยื่อกุ้งสกุล <i>Macrobrachium</i>	50
การตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งจากตามธรรมชาติ โดยวิธี immunohistochemistry.....	50
การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสโรค หัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry.....	51
การตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำ ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.....	52
การตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR...	54
5 สรุปและอภิปรายผล.....	73

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	76
ภาคผนวก.....	80
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	88

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	เปรียบเทียบลักษณะของกุ้งกะต๋อม1 <i>M. equidens</i> และกุ้งกะต๋อม2 <i>M. sintangense</i>	13
2	การตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry ใน กุ้งก้ามกราม <i>M. rosenbergii</i> และ กุ้งฝอย <i>M. lanchesteri</i> ที่ได้จาก ธรรมชาติ (0 วัน)และหลังจากฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 5 วันโดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกวัน.....	50
3	การตรวจสอบการเป็นพาหะไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งสกุล <i>Macrobrachium</i> จากธรรมชาติ (0วัน) และหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรค หัวเหลืองเป็นเวลา 30 วัน.....	52
4	การตรวจสอบการเป็นพาหะไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งสกุล <i>Macrobrachium</i> จากธรรมชาติ (0 วัน) และหลังการทำให้ติดเชื้อโดย การให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองติดต่อกันเป็น เวลา 30 วัน.....	53
5	สรุปผลจากการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งที่จับจาก ธรรมชาติ จากการทดลองโดยการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และจาก การทดลองโดยการกินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ..	75
6	ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งทดลอง.....	85

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงการหยด first antibody บนเซกชันในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหัว เหลือในกึ่งทดลองที่ส่วนหัวมีขนาดเล็ก.....	35
2 แสดงการหยด first antibody บนเซกชันในการตรวจหาเชื้อไวรัส โรคหัวเหลือในกึ่งทดลองที่ส่วนหัวมีขนาดใหญ่.....	36
3 การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology.....	42
4 ขั้นตอนการตรวจเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือในเนื้อเยื่อกึ่งโดยวิธีอินไดเรค อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (Indirect immunoperoxidase method).....	43
5 ขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง.....	44
6 ขั้นตอน RT-PCR.....	45
7 ลักษณะของกึ่งก้ามกราม <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	47
8 ลักษณะของกึ่งฝอย <i>Macrobrachium lanchesteri</i>	48
9 ลักษณะของกึ่งกะต้อม1 <i>Macrobrachium sintangense</i>	48
10 ลักษณะของกึ่งกะต้อม2 <i>Macrobrachium equidens</i>	49
11 RT-PCR ของกึ่งฝอย <i>Macrobrachium lanchesteri</i> (ซ้าย) และ กึ่งกะต้อม1 <i>Macrobrachium sintangense</i> (ขวา).....	54
12 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือเนื้อเยื่อ บริเวณ nerve cord (ซ้าย) และ hepatopancreas (ขวา) ของกึ่งฝอย <i>M. lanchesteri</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือ เป็นเวลา 3 วัน.....	55
13 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือบริเวณ เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของกึ่งฝอย <i>M. lanchesteri</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัว เหลือเป็นเวลา 3 วัน.....	56

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
14 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ hepatopancreas (ซ้าย) และ connective tissue (ขวา) ของกึ่ง กะต้อม1 <i>M. sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็นเวลา 3 วัน.....	57
15 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ hepatopancreas (ซ้าย) และ หัวใจ (ขวา) ของกึ่งกะต้อม1 <i>M. sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็นเวลา 3 วัน.....	58
16 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ เนื้อเยื่อ connective tissue (ซ้าย) และ ovary (ขวา) ของกึ่งกะต้อม1 <i>M. sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็นเวลา 3 วัน.....	59
17 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ connective tissue (ซ้าย)และเนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก (ขวา)ของ กึ่งกะต้อม1 <i>M. sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็น เวลา 3 วัน.....	60
18 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ กล้ามเนื้อของกึ่งกะต้อม1 <i>M. sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้ว เหลืองเป็นเวลา 10 วัน.....	61
19 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณหัวใจ ของกึ่งกะต้อม1 <i>M. sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็น เวลา 10 วัน.....	62
20 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ ovary ของกึ่งกะต้อม1 <i>M. sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้ว เหลืองเป็นเวลา 30 วัน.....	63
21 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ เหงือก(ซ้าย) และ hepatopancreas (ขวา) ของกึ่งกะต้อม1 <i>M.</i> <i>sintangense</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็นเวลา 30 วัน.....	64
22 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองในเนื้อเยื่อ hepatopancreas (ซ้าย) และ หัวใจ (ขวา) ของกึ่งกะต้อม2 <i>M.</i> <i>equidens</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็นเวลา 3 วัน.....	65

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
23 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองในเนื้อเยื่อ hepatopaneas ของกึ่งกะต่อม2 <i>M. equidens</i> ที่ฉีดเชื้อไวรัส โรคห้วเหลืองเป็นเวลา 10 วัน.....	66
24 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองในเนื้อเยื่อ บริเวณ hepatopaneas ของกึ่งฝอย <i>M. lanchesteri</i> ที่กินเนื้อเยื่อ กึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็นเวลา 20 วัน.....	67
25 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (ก.) และ hepatopaneas (ข.) ของกึ่งฝอย <i>M.</i> <i>lanchesteri</i> ที่กินเนื้อเยื่อกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็น เวลา 30 วัน	68
26 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ hepatopaneas ของกึ่งกะต่อม1 <i>M.sintangense</i> ที่กินเนื้อเยื่อกึ่ง กุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลือง เป็น เวลา 10 วัน.....	69
27 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ hepatopaneas (ซ้าย) และ connective tissue (ขวา) ของ กึ่งกะต่อม1 <i>M. sintangense</i> ที่กินเนื้อเยื่อกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส โรคห้วเหลือง เป็นเวลา 10 วัน.....	70
28 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ hepatopaneas ของกึ่งกะต่อม1 <i>M.sintangense</i> ที่กินเนื้อเยื่อ กึ่งกุลาดำติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็นเวลา 30วัน.....	71
29 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองบริเวณ เนื้อเยื่อ hepatopaneas ของกึ่งกะต่อม2 <i>M. equidense</i> ที่กิน เนื้อเยื่อกึ่งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคห้วเหลืองเป็นเวลา 5 วัน.....	72
30 จำนวนกึ่งที่เหลือตลอดช่วงเวลาในการทดลอง 30 วัน.....	86

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็วจนมีบทบาทต่อโครงสร้างทางเศรษฐกิจของประเทศค่อนข้างมาก ซึ่งรัฐบาลก็เห็นความสำคัญของการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยมีนโยบายและมาตรการต่าง ๆ ที่สนับสนุนการพัฒนา ด้านประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำภายในประเทศให้ก้าวหน้ายิ่งขึ้นโดยที่การพัฒนาดังกล่าว จำเป็นต้องเร่งการเพิ่มผลผลิตทั้งเพื่อการบริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก

สัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ กุ้งทะเล ซึ่งจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญเนื่องจากเป็นที่นิยมบริโภคโดยทั่วไป เพราะรสชาติดี ประกอบอาหารได้หลายชนิด เป็นแหล่งของสารอาหารประเภทโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ดังนั้นกุ้งจึงเป็นสินค้าสำคัญ เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ กุ้งทะเลที่สำคัญได้แก่ กุ้งกุลาดำ (Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*) ซึ่งแต่เดิมนั้นกุ้งทะเลจะได้อาหารจากการทำประมงจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งแหล่งทำการประมงที่สำคัญของประเทศไทยคือ อ่าวไทย และทะเลอันดามัน เมื่อมีการจับกุ้งกันมากขึ้น ปริมาณที่จับได้ก็ลดลง ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศที่เพิ่มมากขึ้นทุกปี ดังนั้นจึงได้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อทดแทนการจับจากแหล่งธรรมชาติ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งได้ขยายตัวเพิ่มมากขึ้น และมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก ดังจะเห็นได้จากมูลค่าการส่งออกกุ้งในแต่ละปีซึ่งสามารถส่งออกและทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมาก โดยที่กุ้งเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ จัดอยู่ใน 10 อันดับของประเทศไทย นับจากปี 2540 เป็นต้นมาปริมาณการส่งออกกุ้งของไทยเพิ่มขึ้นทั้งปริมาณและมูลค่า จากมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้ง 75,690 ล้านบาทในปี 2540 เพิ่มขึ้นเป็น 119,574 ล้านบาทในปี 2543 และมูลค่าการส่งออกปี 2544 - 2546 เป็น 98,341 73,870 และ 71,472 ล้านบาทตามลำดับ โดยส่งออกทั้งในรูปของกุ้งแช่แข็ง และกุ้งที่แปรรูป (นุชจรินทร์ เกตุนิล. 2545 : 46-55 ; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546 : ออนไลน์) โดยที่สินค้ากุ้งเกือบทั้งหมดมาจากการเพาะเลี้ยง

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งนั้นนอกจากจะทำรายได้ให้กับประเทศแล้วยังมีผลทำให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกจำนวนมากได้แก่ การผลิตอาหารและเคมีภัณฑ์สำหรับกุ้ง เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงกุ้ง อุตสาหกรรมการเพาะพันธุ์กุ้ง การแปรรูปกุ้งเป็นต้น ซึ่งอุตสาหกรรมต่อเนื่องต่าง ๆ เหล่านี้ก่อให้เกิดการกระจายรายได้ การจ้างงานภายในประเทศ ซึ่ง

เป็นผลดีต่อเศรษฐกิจของประเทศ และด้วยความสามารถที่ได้เปรียบในด้านสภาพภูมิประเทศที่เอื้ออำนวยต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ความสามารถของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยง ผู้แปรรูปกุ้ง ผู้ส่งออก ประกอบกับมีหน่วยงานจากทั้งภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ส่งผลให้กุ้งและผลิตภัณฑ์กุ้งของไทยมีคุณภาพเป็นที่ต้องการและยอมรับของตลาดโลก อย่างไรก็ตาม ภายใต้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งเพื่อการบริโภคภายในประเทศ และเพื่อการส่งออกของประเทศไทยก็มิได้ราบรื่นนัก ยังต้องเผชิญกับปัญหาต่าง ๆ อีกมาก ได้แก่ ปัญหาโรคกุ้ง ปัญหาสภาพแวดล้อมของแหล่งเพาะเลี้ยงเช่นปัญหาคูณภาพน้ำ หรือการตกค้างของสารฆ่าแมลง ปัญหาการบุกรุกพื้นที่ป่าชายเลน ปัญหาเกี่ยวกับการแข่งขันด้านการผลิตและการตลาด การกีดกันทางการค้า ซึ่งปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลกระทบทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงและการส่งออกกุ้งเป็นอย่างมาก เนื่องจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นธุรกิจที่ให้ผลตอบแทนสูงจึงมีการขยายตัวของพื้นที่เพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งขยายตัวเพิ่มขึ้นแต่ประสิทธิภาพการผลิตกลับลดลงเมื่อพิจารณาถึงผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อผลผลิตกุ้งที่สำคัญคือโรค ทั้งโรคจากไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา โดยเฉพาะโรคติดเชื้อจากไวรัส ไวรัสที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงมีหลายชนิดได้แก่ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus ; YHV) และไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus ; WSSV) (Flegel, et al. 1997: 285-302)

ปัญหาการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำก่อให้เกิดผลเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย การระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองพบครั้งแรกจากบ่อเลี้ยงกุ้งที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงต้นปี 2535 หลังจากนั้นในราวปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคมได้แพร่ระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งบริเวณรอบทะเลสาบสงขลาและแพร่เข้าสู่จังหวัดปัตตานีในราวกลางเดือนมิถุนายน (สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. 2535 : 200-205)

ลักษณะอาการของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองที่สังเกตได้โดยทั่วไป พบว่ากุ้งจะมาเกยอยู่บริเวณขอบบ่อ การกินอาหารลดลง กุ้งมีอาการอ่อนเพลีย ไม่มีแรงติด ลำตัวซีด ส่วนหัวซึ่งเป็นส่วนดับ ดับอ่อนและเหงือกจะมีสีเหลืองเห็นได้ชัดเจน ในวันที่สองหลังจากที่เริ่มเห็นอาการของโรค กุ้งจะตายเพิ่มขึ้นประมาณ 50% และ 70% ในวันที่สาม กุ้งจะตายหมดหรือเกือบหมดในวันที่สี่และห้า หลังจากเริ่มมีอาการให้เห็น (สิทธิ บุญยรัตผลินและคณะ. 2535 : 200-205) ยังไม่มีสารเคมีหรือยาใด ๆ รักษาโรคหัวเหลืองได้ ดังนั้นวิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่นักวิชาการต้องทำการศึกษา เพื่อเสนอแนะวิธีการป้องกันที่ดีที่สุดแก่ผู้เพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ การจัดสภาพแวดล้อมในบ่อเพาะเลี้ยงที่ดี ไม่ใช้อาหารสดในการเลี้ยงกุ้ง รวมทั้งไม่ใช้อุปกรณ์ระหว่างบ่อเลี้ยงปนกัน (Flegel & Fegan. 1993 : 1 -17) นอกจากนี้การกำจัดสัตว์ต่าง ๆ ที่เชื่อว่าอาจเป็นพาหะของไวรัสก่อนปล่อยลงบ่อเลี้ยงก็จะเป็นการป้องกันการระบาดของไวรัส

หัวเหลืองได้ การตรวจวินิจฉัยเพื่อพิสูจน์ทราบชนิดของสัตว์ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสต่าง ๆ ก็เป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อเป็นแนวทางการป้องกันสัตว์ที่อาจเป็นพาหะเข้าสู่ระบบการเลี้ยง

การป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคหัวเหลืองนั้น นับตั้งแต่มีการระบาดของไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นต้นมา ก็ได้มีผู้ที่ทำการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องมาตลอด แต่ในปัจจุบันทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และลูกกุ้งวัยอ่อนก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์มโดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ทำให้ผู้ตรวจวินิจฉัยสามารถตรวจเชื้อไวรัสนี้ได้แม้จะมีปริมาณน้อย ใช้เวลาในการตรวจได้รวดเร็ว มีความไวสูง (Wongteerasupaya, et al. 1997 : 81-146) แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการพิเศษ บุคลากรที่มีความชำนาญ รวมทั้งค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ในการเตรียมตัวอย่างและการตรวจสอบยังค่อนข้างสูง

ในปี 2000 ไพศาล สิทธิกรกุล และคณะ (Sithigorngul, et al. 2000 : 71-76) สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำได้สำเร็จ ทำให้สามารถใช้แอนติบอดีนี้ตรวจการติดเชื้อ YHV โดยวิธี Immunohistochemistry ได้อย่างสะดวก และเสียค่าใช้จ่ายน้อย ดังนั้นจึงสามารถใช้แอนติบอดีนี้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในสัตว์ที่คาดว่าอาจเป็นพาหะได้อย่างกว้างขวาง

จากการที่ ยัยนับ แวและ. (2544) ได้สำรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองของกุ้งชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Palaemonidae Penaeidae และ Atyidae จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งโดยวิธี Immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัสหัวเหลืองคือ V3-2B, Y18-2D และ Y19 ผลการทดลองไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากกุ้งที่ได้จากธรรมชาติทั้ง 3 วงศ์ กุ้งในวงศ์ Penaeidae คือ *Metapenaeus affinis* เท่านั้นที่ พบว่าการติดเชื้อไวรัสหลังจากการให้เชื้อไวรัสโดยการกิน กุ้งส่วนใหญ่มีการติดเชื้อรุนแรงเมื่อได้รับเชื้อโดยการฉีด ส่วนกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ทุกชนิด ไม่มีการติดเชื้อโดยการกิน แต่การให้เชื้อโดยการฉีดและพบว่ากุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และกุ้งฝอย *M. lanchesteri* มีสัดส่วนน้อยมากที่แสดงการติดเชื้อ แต่กุ้งกระด้อม *M. sintangense* และกะปေး *P. styliiferus* จะมีการติดเชื้อแต่ไม่รุนแรง จากผลการศึกษาของยัยนับ แวและ ครั้งนี้กุ้งสกุล *Macrobrachium* ได้แก่กุ้งฝอย *M. lanchesteri* และ กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* สามารถทนต่อการติดเชื้อได้ดี มีสัดส่วนการติดเชื้อน้อยมากแม้ว่าจะได้รับการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองก็ตาม ซึ่งอาจเป็นเพราะกุ้งฝอย *M. lanchesteri* และ กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* อาจมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากพบสัดส่วนการติดเชื้อน้อยมาก

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองของกุ้งชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Macrobrachium* ซึ่งกุ้งบางชนิดอาจมีความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองและอาจมีศักยภาพในการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองได้

ความมุ่งหมายในการวิจัย

เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium* ชนิดต่าง ๆ ที่จับจากธรรมชาติ จากการทดลองด้วยวิธีการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และจากการทดลองโดยให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อของกุ้งในสกุล *Macrobrachium* ที่อาจเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสหัวเหลือง
2. เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการและวางแผนแนวทางการป้องกันการการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสหัวเหลือง

ขอบเขตของการวิจัย

1. ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองของกุ้งในสกุล *Macrobrachium* จากแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้ง จังหวัดสมุทรปราการ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และจังหวัดสุพรรณบุรี
2. ศึกษาการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่มีเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium* ชนิดต่าง ๆ จำนวนกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองชนิดละประมาณ 120-200 ตัว
3. ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ในกุ้งชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Macrobrachium* จากธรรมชาติ กุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และกุ้งที่ให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่มีเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยวิธี Immunohistochemistry
4. ตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Macrobrachium* จากธรรมชาติ กุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และกุ้งที่ให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่มีเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR

นิยามศัพท์เฉพาะ

ศัพท์ที่ 1 Yellow head virus (YHV)

หมายถึง ไวรัสหัวเหลือง อยู่ใน family rhabdovirus มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (bacilliform) ขนาด 50-60 X 190-200 nm ภายในเป็นนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ล้อมรอบด้วยเปลือกหุ้ม (envelope) ที่เป็นปุ่มปมหรือหนาม มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ได้แก่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 170 135 67 และ 22 ตามลำดับ

ศัพท์ที่ 2 Indirect peroxidase immunohistochemistry

หมายถึง เทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน (antigen) ในเนื้อเยื่อโดยอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อกัน เทคนิคนี้จะใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยสารบางชนิดเช่นเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ horseradish peroxidase มาติดกับแอนติบอดีตัวที่สอง จากนั้นตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยการตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรตคือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารที่ทำให้เกิดสี (chromogen) คือ 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase กลายเป็นผลิตภัณฑ์ (product) คือออกซิเจนและน้ำ ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB ทำให้เกิดตกตะกอน สีน้ำตาลในตำแหน่งที่มีเอนไซม์อยู่ ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งที่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาคือ เชื้อ YHV

ศัพท์ที่ 3 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

PCR (polymerase chain reaction) หมายถึงวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สนใจในห้องปฏิบัติการซึ่งได้แก่ DNA ได้อย่างรวดเร็วไม่ว่าจะเป็นสารพันธุกรรมของไวรัส แบคทีเรีย หรือสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide primer) สายสั้น ๆ ประมาณ 15 - 40 เบส ที่มีความจำเพาะกับลำดับ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวนในการเพิ่มปริมาณ DNA จะเติมเอนไซม์ DNA polymerase เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้น ส่วนเทคนิค RT-PCR นั้นเป็นการเพิ่มจำนวน DNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase สร้างสาย cDNA ขึ้นมาจาก RNA ก่อนแล้วจึงทำการทดลอง PCR

สมมติฐานในการวิจัย

กิ้งในสกุล *Macrobrachium* ที่อาศัยอยู่ในแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำบางชนิดอาจมีความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และอาจเป็นพาหะของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

ชื่อสามัญหรือชื่อที่ตั้งจากเชื้อที่เกิดโรค ได้แก่ Yellow-head disease , YH disease หรือ YHD of *P. monodon* หรือ Yellow-head baculovirus (YBV) หรือ Yellow-head disease baculovirus (YHDBV) หรือ Yellow-head virus (YHV)

ในระยะแรก ได้มีนักวิจัยรายงานถึงเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็น baculovirus ชนิด B ที่ทำให้เกิดเม็ดเล็ก ๆ ในไซโตพลาสซึม (Type B cytoplasmic granulosis baculovirus หรือ baculo-like virus) จึงให้ชื่อว่า “yellow head baculovirus” แต่พบว่า YHV ไม่ใช่ baculovirus เนื่องจากโครงสร้าง YHV เป็น RNA สายเดี่ยว (ss RNA)

นาดาลา และคณะ (Nadala. et al. 1997 : 39-44) ได้ทำการศึกษาไวรัสโรคหัวเหลืองจากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและย้อมด้วยวิธี negative stained พบไวรัสมีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) ภายในเป็น nucleocapsid ล้อมรอบด้วยเปลือกหุ้ม (envelope) ที่เป็นปุ่มปมหรือหนาม ขนาด 50-60 x 190-200 nm แต่จากการศึกษาด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) พบว่าไวรัสนี้มีจีโนม (genome) เป็น RNA สายเดี่ยว (single stranded RNA) (Wongteerasupaya. et al. 1995 : 45-50)

นอกจากนี้นาดาลา และคณะ (Nadala. et al. 1997 : 39-44) ยังได้ทำการวิเคราะห์โครงสร้างโปรตีนของไวรัสด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot พบว่าประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 170 135 67 และ 22 KDa ตามลำดับ นอกจากนั้นพบว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135 KDa นั้นมีส่วนของโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตมาเชื่อมโยงได้แก่ glycosylated และเนื่องจากไวรัสโรคหัวเหลือง มีคุณสมบัติหลายประการ คล้ายคลึงกับ rhabdovirus จึงถูกจัดกลุ่มอยู่ใน family rhabdovirus

การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองนั้น พบครั้งแรกในประเทศไทย และการกระจายตัวพบได้กว้างขวางในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และในแปซิฟิก และพบรายงานที่ไม่รับรองว่ามีการระบาดอย่างรุนแรงในมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ จีน และได้หวัน

วิธีการสำหรับควบคุมโรค ยังไม่มีวิธีการที่แน่นอน ปัจจุบันใช้วิธีการตรวจสอบขั้นต้น และการใช้การฆ่าเชื้อในรายที่เกิดโรคขึ้น การศึกษาเกี่ยวกับพาหะนำโรคยังไม่ยืนยันแน่ชัด แต่การลดความเครียดโดยควบคุมสภาวะแวดล้อมในบ่อเลี้ยงให้เหมาะสมอาจช่วยได้

ชนิดและลักษณะของกุ้งในสกุล *Macrobrachium*

กุ้งสกุล *Macrobrachium* จัดตามลำดับอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class crustacea

Order Decapoda

Family Palaemonidae

Genus *Macrobrachium*

ชนิดกุ้งในสกุล *Macrobrachium* ที่ใช้ในการทดลองได้แก่

1. กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*
2. กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri*
3. กุ้งกะต๋อม1 *Macrobrachium sintangense*
4. กุ้งกะต๋อม2 *Macrobrachium equidens*

ลักษณะของกุ้งสกุล *Macrobrachium*

1. กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* มีลักษณะดังนี้

(พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. 2518 : 42-46)

กรีส่วนโคนที่อยู่เหนือตาโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย ส่วนปลายมีลักษณะเรียวอนขึ้น และยาวเลยปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ด้านบนของกรีมีแฉะยื่นแบบฟันเลื่อย 13 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 2 อัน อยู่บนส่วนโค้งนูนเหนือตา 4 อัน และเรียงอยู่ถัดไปทางปลายของกรี 7 อัน แฉะยื่น 2 อัน ที่อยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace กับแฉะยื่น 3 อัน ที่อยู่ปลายสุดของกรีจะเรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน และมีระยะห่างมากกว่าระยะห่างระหว่างแฉะยื่นของกรีที่อยู่บนส่วนโค้งนูนเหนือตา แต่มีระยะห่างน้อยกว่าระยะห่างระหว่างแฉะยื่นของกรี 3 อัน ที่อยู่ถัดจากส่วนโค้งนูนเหนือตาออกไปทางปลายของกรี ด้านล่างของกรีมีแฉะยื่นแบบฟันเลื่อย 13 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากันตลอดความยาวของกรี ด้านข้างของกรีเป็นสันยาวจากเบ้าตาไปจนถึงแฉะยื่นอันที่ 9 หรืออันที่ 10 ของกรีทางด้านบน

Carapace ผิวเกลี้ยงเรียบ นอกจากบริเวณหัวใจ บริเวณกระเพาะอาหารและบริเวณที่อยู่เหนือหนามตรงบริเวณตับ มีเม็ดเล็ก ๆ อยู่กระจัดกระจาย สันของหนามตรงบริเวณหนวดและสันของหนามตรงบริเวณตับ ขนานกันและทำมุมกับแนวราบเล็กน้อย

แผ่นกำบังหวดคู่ที่ 2 ขอบด้านนอกตรง ขอบด้านในตรงและขนานกันกับขอบด้านนอก ปลายของแผ่นเรียวแหลม

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวไม่เท่ากัน ขาข้างที่ยาวจะมีส่วนปลายของข้อที่ 4 อยู่ตรงกับปลายของแผ่นกำบังหวดคู่ที่ 2 ข้อที่ 3 ข้อที่ 4 และข้อที่ 5 เป็นรูปทรงกระบอก ตอนปลายของข้อหนากว่าตอนโคน คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 3 ต่อ 2 ส่วนโคนของข้อที่ 6 เป็นรูปทรงกระบอกแบนจากบนมาล่างเล็กน้อย และมีความกว้างเท่ากันตลอดผิวโดยรอบของข้อที่ 3 ข้อที่ 4 ข้อที่ 5 และส่วนโคนของข้อที่ 6 มีหนามแหลมเรียงกระจายเป็นแถวซึ่งหนามแหลมที่อยู่บนผิวด้านนอกมีขนาดเล็กและสั้นกว่าหนามแหลมที่อยู่บนผิวด้านใน นิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก มีขนาดเล็กและเรียวกว่าส่วนโคนของข้อที่ 6 ตอนปลายแหลมและจุ่มเข้า ผิวด้านนอกของนิ้วมีหนามแหลมและเล็กเรียงอยู่กระจัดกระจาย นอกจากตอนปลายที่แหลมและจุ่มเข้า จะเกลี้ยงเรียบ ด้านในของนิ้วมีปุ่ม 2 ปุ่มติดกัน และแฉ่งเป็นรูปกรวย 1 อัน อยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $\frac{1}{7}$ และ $\frac{1}{4}$ ของความยาวนิ้วตามลำดับ ถัดจากแฉ่งเป็นรูปกรวยออกไปเป็นสันคมและยาวไปจนถึงปลายที่แหลมจุ่ม นิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวได้ เป็นรูปทรงกระบอกและมีขนาดเท่ากับนิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้ ผิวด้านนอกของนิ้วที่มีขนปกคลุมและยาวคลุมอย่างหนาแน่นอยู่ตลอดความยาวของนิ้ว นอกจากตอนปลายที่แหลมจุ่มเข้าจะเกลี้ยงเรียบ ด้านในของนิ้วมีแฉ่งเป็นรูปกรวยที่มีขนาดเท่ากับ 2 อัน อยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $\frac{1}{5}$ และ $\frac{1}{4}$ ของความยาวนิ้วตามลำดับ ถัดจากแฉ่งอันที่ 2 ออกไปเป็นสันคมและยาวไปจนถึงปลายของนิ้วที่แหลมจุ่ม เมื่อหุบก้ามหนีบเข้ามาปลายของนิ้วนี้จะเกยกับปลายของนิ้วของก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวไม่ได้ ข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวจากน้อยไปหามาก ตามลำดับดังนี้ ข้อที่ 3 ข้อที่ 4 ข้อที่ 5 ส่วนโคนของข้อที่ 6 และนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบซึ่งมีความยาวเท่ากัน

หาง เป็นรูปสามเหลี่ยม ตอนปลายเป็นแฉ่งแหลมเล็ก สองข้างของแฉ่งแหลม มีหนามแหลม 2 คู่ คู่ในมีขนาดใหญ่และยาวกว่าคู่นอก

แพนหาง ปลายของแพนหางคู่นอก มีลักษณะตัดเป็นเส้นตรงและปลายของแพนหางคู่ในเรียวแหลมเล็กน้อย

ไข่ เป็นรูปกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 500 μ

สี ลำตัวเป็นสีน้ำเงินแกมเขียว ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นสีน้ำเงินเข้ม

ขนาดของลำตัว มีความยาวโดยเฉลี่ยประมาณ 190 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัย พบในแม่น้ำ ลำคลอง ลำห้วย ลำธาร ทะเลสาบ หรือแหล่งน้ำที่มีทางติดต่อกับทะเล

2. กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* มีลักษณะดังนี้

(พิมพ์พรรณ ลีละวัฒนากุล. 2518 : 28-34)

ก๊รี มีลักษณะตรงและยาวพอดีกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขอบบนมีแฉะยื่นแบบฟันเลื่อย 7 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 1 อัน เหนือเบ้าตา 4 อัน และที่ปลายของก๊รี 2 อัน แฉะแต่ละอันเรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน นอกจากแฉะ 2 อันสุดท้ายที่อยู่ปลายก๊รี จะอยู่ห่างจากแฉะอันที่ 5 มาก ขอบล่างมีแฉะแบบฟันเลื่อย 3 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน ด้านข้างของก๊รีเป็นสันยาวจากเบ้าตาไปจนถึงแฉะอันที่ 6 ของก๊รีด้านบน

Carapace บริเวณผิวเกลี้ยงและเรียบ สันของหนามตรงบริเวณหนวดขนานกับสันของหนามตรงบริเวณตับและทำมุมกับแนวราบเล็กน้อย

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ก่อนข้างเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าและปลายมีลักษณะกลมมน ขอบด้านในขนานกับขอบด้านนอก

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวเรียว และขาสองข้างยาวเท่ากัน มีส่วนของก้ามหนีบยาวเลยปลายของก๊รี ผิวโดยรอบเกลี้ยงเรียบ นอกจากนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบจะมีกลุ่มขนที่แข็ง กระจายอยู่เป็นกลุ่ม ข้อที่ 5 เป็นรูปทรงกระบอกยาวและเรียวบางกว่าข้ออื่น ๆ ตอนกลางของส่วนโคนของข้อที่ 6 โป่งออกเล็กน้อย ด้านในของนิ้วทั้งสองของก้ามหนีบมีแฉะรูปกรวยอยู่นิ้วละ 2 อัน เรียงอยู่ห่างจากโคนของนิ้วประมาณ $\frac{1}{4}$ และ $\frac{1}{3}$ ของความยาวของนิ้วตามลำดับ ข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวเรียงจากน้อยไปหามากตามลำดับ ดังนี้ นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบ ข้อที่ 3 ส่วนโคนของข้อที่ 6 ข้อที่ 4 และข้อที่ 5

หาง เป็นรูปสามเหลี่ยมยาวเรียวและยาวไม่ถึงปลายของแพนหาง ปลายสุดเป็นแฉะแหลมเล็กและมีหนามแหลม 2 คู่ อยู่สองข้างของแฉะแหลม หนามคู่ในมีขนาดใหญ่และยาวกว่าหนามคู่นอก ผิวด้านบนของหางโค้งมนและมีหนามแหลม 2 คู่ อยู่ห่างจากโคนของหางประมาณ $\frac{1}{2}$ และ $\frac{3}{4}$ ของความยาวของหาง

แพนหาง ยาวเลยหางออกไปเล็กน้อย ปลายของแพนหางคู่ในกลมรี และปลายของแพนหางคู่นอกกลมมน

ไข่ เป็นรูปกลมรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 700 μ

สี ลำตัวใส ไม่มีสี

ขนาดของลำตัว ความยาวของลำตัวโดยเฉลี่ย 37 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัย อาศัยอยู่ในแม่น้ำ คู คลอง หนอง บึง หรือเกาะอยู่ตามก้อนหินใหญ่ใน
แอ่งน้ำตื้น

3. กุ้งต่อม1 *Macrobrachium sintangense* มีลักษณะดังนี้

(พิมพ์พรรณ สิละวัฒนากุล. 2518 : 47-50)

กฐี มีลักษณะเรียวยาวเลยแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ตอนปลายงอนขึ้นเล็กน้อย
ขอบทางด้านบนของกฐีมีแฉะแบบฟันเลื่อย 11 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของ carapace 3 อัน
และเรียงอยู่ถัดไปทางปลายกฐี 8 อัน แฉะแต่ละอันเรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน นอกจากแฉะอัน
ที่ 10 และอันที่ 11 จะอยู่ห่างจากแฉะอันที่ 9 ออกไปมาก ขอบทางด้านล่างของกฐีมีแฉะ
แบบฟันเลื่อย 6 อัน เรียงอยู่ห่างเป็นระยะเท่ากัน ด้านข้างของกฐีเป็นสันยาวจากเบ้าตาไปจนถึง
แฉะอันที่ 9 ของกฐีด้านบน

Carapace ผิวเกลี้ยงเรียบ สันของหนามตรงบริเวณหนวดกับสันของหนามตรง
บริเวณตับเรียงอยู่ขนานกันในแนวราบ หนามตรงบริเวณหนวดมีขนาดใหญ่ และยาวกว่าหนาม
ตรงบริเวณตับ

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 มีลักษณะเรียวยาว ขอบทางด้านนอกมีลักษณะตรง ตอนโคน
ของขอบด้านในโค้งออกเล็กน้อยและเรียวสอบเข้าไปทางปลายของแผ่น

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกเรียวยาว ผิวโดยรอบของข้อที่ 3 เกลี้ยงและเรียบ
ข้อที่ 4 ข้อ 5 และส่วนโคนของข้อที่ 6 มีลักษณะเหมือนกันคือ ผิวโดยรอบมีปื้นสีน้ำตาลอยู่เป็น
หย่อม และมีหนามเล็ก ๆ เรียงกระจายอยู่ทั่วไป นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบมีลักษณะเป็นรูป
ทรงกระบอกเล็กและเรียว ตอนปลายงุ้มเข้าเล็กน้อย เมื่อหุบก้ามหนีบเข้ามาปลายของนิ้วทั้งสอง
จะชนกัน ผิวโดยรอบเกลี้ยงและเรียบ และมีปื้นสีน้ำตาลกระจายอยู่เป็นหย่อม ตรงโคนทางด้าน
ในของนิ้วตรงก้ามหนีบซึ่งเคลื่อนไหวได้มีปุ่มทู่อยู่ 3 อัน และของนิ้วตรงก้ามหนีบ ซึ่งเคลื่อนไหว
ไม่ได้มีแฉะรูปกรวย 1 อัน ต่อจากปุ่มหรือแฉะยื่นออกไปเป็นสันคม และยาวจนถึงปลายนิ้วที่งุ้ม
ความยาวของข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวจากน้อยไปมาก ตามลำดับดังนี้คือ นิ้วทั้ง
สองของก้ามหนีบข้อที่ 3 ซึ่งยาวเท่ากับส่วนโคนของข้อที่ 6 ข้อที่ 4 และข้อที่ 5

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

แพนหาง ยาวเลยส่วนหางออกไปเล็กน้อย ปลายของแพนหางคู้นอก มีลักษณะกลมมนและปลายหางของแพนหางคู้ในมีลักษณะกลมรี

ไข่ มีลักษณะกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ $1,200 \mu$

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

ขนาดของลำตัว ความยาวของลำตัวโดยเฉลี่ย 63 มิลลิเมตร

ถิ่นอาศัยอยู่ในแม่น้ำ ลำคลอง หรือแหล่งน้ำที่มีทางติดต่อกับทะเล

4. กุ้งกะต๋อม2 *Macrobrachium equidens* มีลักษณะดังนี้

(พิมพ์พรรณ ลีละวัฒนากุล. 2518 : 21-24)

ก๊รี มีลักษณะเรียวยาวตรง ตอนปลายงอนขึ้นเล็กน้อย แ่งยื่นแบบฟันเลื่อยของก๊รีด้านบน มีจำนวน 12 อัน และของก๊รีทางด้านล่างมี 5 อัน ขาเดินคู่ที่ 2 ของตัวผู้ยาวกว่าความยาวของลำตัวและผิวโดยรอบมีปื้นสีน้ำตาลกระจายอยู่ทั่วไป ขาเดินคู่ที่ 2 ของตัวเมียจะสั้นกว่าความยาวของตัว และมีสีดำ

ก๊รี ยาวเลยแผ่นกำบัง หนวดคู่ที่ 2 ขอบด้านบนมีแ่งยื่นแบบฟันเลื่อยจำนวน 12 อัน เรียงอยู่เหนือส่วนหน้าของคาราเปส 3 อัน บริเวณเหนือตา 5 อัน และอีก 4 อัน เรียงอยู่ถัดไปทางปลายของก๊รีระยะห่างระหว่างแ่งยื่นที่อยู่เหนือส่วนหน้าของคาราเปสมากกว่าระยะห่างระหว่างแ่งยื่นที่อยู่เหนือตา แต่จะน้อยกว่าระยะห่างระหว่างแ่งยื่นที่อยู่ตอนปลายของก๊รี ของด้านล่างมีแ่งยื่นแบบฟันเลื่อยจำนวน 5 อัน เรียงอยู่ห่างกันเป็นระยะเพิ่มมากขึ้นจากโคนไปจนถึงปลายของก๊รีตามลำดับ ด้านข้างของก๊รีเป็นสันยาวจากเบ้าตาไปจนถึงแ่งยื่นอันที่ 11 ของก๊รีทางด้านบน

คาราเปส บริเวณผิวเกลี้ยงและเรียบ นอกจากบริเวณมุมด้านข้างตอนหน้ามีตุ่มเล็ก ๆ เรียงอยู่กระจัดกระจาย สันของหนามตรงบริเวณหนวดและหนามตรงบริเวณดัดไม่อยู่ในแนวเส้นตรงเดียวกัน แต่จะขนานกันในแนวราบ

แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขอบด้านนอกมีลักษณะตรง ตรงโคนของของด้านในโค้งออก และเรียวสอบเข้าไปทางปลาย

ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกและยาวกว่าความยาวของลำตัว ข้อที่ 3 ข้อที่ 4 ข้อที่ 5 และส่วนโคนของข้อที่ 6 มีลักษณะเหมือนกัน คือ เป็นรูปทรงกระบอก ผิวโดยรอบมีปื้นสีน้ำตาลเงินกระจายอยู่ทั่วไป และมีหนามแหลมขนาดเล็กเรียงอยู่กระจัดกระจาย ซึ่งหนามแหลมที่อยู่บนผิวด้านล่างมีขนาดใหญ่กว่าหนามแหลมที่อยู่บนผิวด้านอื่น บนผิวด้านนอกและด้านในมีร่องตามความยาวด้านละ 1 ร่อง นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบมีรูปร่างลักษณะเหมือนกัน คือ เป็นรูปทรงกระบอก ตอนปลายจุ่มเข้าเล็กน้อย และผิวโดยรอบมีขนปกคลุมอยู่หนาแน่น ยกเว้นผิวด้านในจะมีแฉะ 2 อัน แฉะอันแรกอยู่ห่างจากโคนประมาณ $1/10$ ของความยาวของนิ้ว และมีลักษณะเป็นปุ่มขนาดเล็กจำนวน 2-3 ปุ่ม แฉะอันที่ 2 อยู่ห่างจากโคนประมาณ $1/5$ ของความยาวของนิ้วและมีลักษณะเป็นรูปกรวยขนาดใหญ่ ความยาวของข้อต่าง ๆ ของขาเดินคู่ที่ 2 มีความยาวจากน้อยไปหามากตามลำดับดังนี้ คือ ข้อที่ 3 นิ้วทั้งสองของก้ามหนีบ ข้อที่ 4 ส่วนโคนของข้อที่ 6 และข้อที่ 5

หาง เป็นรูปสามเหลี่ยม ตอนปลายป้านเล็กน้อยและยาวเกือบถึงแพนหาง ผิวด้านบนค่อนข้างเป็นรูปเหลี่ยม และตอนปลายมีหนามแหลม 2 คู่ เรียงอยู่ห่างจากโคนของหางประมาณ $1/2$ และ $3/4$ ของความยาวของหางตามลำดับ ขอบปลายสุดของหางมีหนามแหลม 2 คู่ คู่ในมีขนาดใหญ่และยาวกว่าคู่นอก ระหว่างหนามแหลมคู่ในมีขนยาวเรียงกระจายแผ่เป็นรูปพัด

แพนหาง แพนหางคู่นอกมีขนาดใหญ่กว่าแพนหางคู่ใน ปลายของแพนหางคู่นอกและปลายของแพนหางคู่ในมีลักษณะกลมมนเหมือนกัน

ไข่ มีลักษณะรี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 600 μ

สีของลำตัว ตัวผู้มีสีเขียว ตัวเมียมีสีเทาหรือสีฟ้าแกมเขียวและบริเวณขอบปลายของส่วนท้องปล้องที่ 3 ทางด้านบนมีแถบสีไม่มีสีคาดตามขวาง ขาเดินคู่ที่ 2 ของตัวผู้มีปื้นสีน้ำตาลเงินอยู่เป็นหย่อมทั่วไป และเมื่อถูกดองด้วยแอลกอฮอล์แล้ว สีจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง ส่วนขาเดินคู่ที่ 2 ของตัวเมียมีสีดำ

ขนาดของลำตัว มีความยาวของลำตัวโดยเฉลี่ย 88 มม.

ถิ่นอาศัยอยู่ในแม่น้ำ หรือแหล่งน้ำที่มีทิศติดต่อกับทะเล

เนื่องจาก *M. equidens* และ *M. sintangense* มีลักษณะคล้ายกันมากจึงมีชื่อเรียกสามัญอย่างเดียวกัน คือ กุ้งกระต้อม กุ้งหัวแข็ง

การเปรียบเทียบ *M. equidens* และ *M. sintangense* ซึ่งมีรูปร่างและขนาดคล้ายคลึงกันมาก แต่มีลักษณะที่แตกต่างกันดังตาราง 1

ตาราง 1 เปรียบเทียบลักษณะของกุ้ง *M. equidens* และ *M. sintangense*

ลักษณะ	<i>M. equidens</i>	<i>M. sintangense</i>
รูปร่างของกรี	ตอนโคนโค้งงอขึ้นและตอนปลายงอนขึ้นเล็กน้อย	ตอนโคนตรงและตอนปลายงอนขึ้นเล็กน้อย
แผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2	ปลายแผ่นป้าน	ปลายแผ่นแหลม
ขาเดินคู่ที่ 2	สองข้างยาวเท่ากันและยาวกว่าความยาวตัว	สองข้างยาวเท่ากันแต่สั้นกว่าความยาวตัว
ก้ามหนีบคู่ที่ 2	มีขนปกคลุม	ไม่มีขนปกคลุม
แพนหาง	คู่ในและคู่นอกเป็นรูปไข่	คู่ในและคู่นอกเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า และมีปลายกลมน
ขนาดของไข่	600 μ	1,200 μ

ที่มา : พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล.(2518) อนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนิคในประเทศไทย . วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. : 74

การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

ไวรัสโรคหัวเหลือง มีรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ.2533 และนับแต่มีการระบาดของไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นต้นมา ก็ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้กันเรื่อยมา เนื่องจากเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โดยรายงานผลการศึกษานักวิจัยทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ได้แก่

ปี 1993 ไชยยุทธ จันทนชุกลิน และคณะ (Chantanachookin, et al. 1993 : 145-157) ได้ศึกษาไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีอาการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากบ่อกุ้งที่มีการระบาดของโรคหัวเหลืองทางภาคใต้ของประเทศไทย นำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดาพบว่าเนื้อเยื่อของ lymphoid organ มีลักษณะผิดปกติอย่างชัดเจน มีการตาย (necrosis) ของเซลล์ พบเซลล์ที่มี vacuole และนิวเคลียสบวมในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) พบการเกิด inclusion ที่ติดสีเบสอยู่ใกล้กับนิวเคลียสที่บวม ลักษณะการเกิด inclusion นี้ยังพบใน interstitial hepatic tissue เนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) กล้ามเนื้อหัวใจ เนื้อเยื่อเหงือก และเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue) ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ต่างจากโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือเชื้อปรสิต เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบ YHV มีรูปร่างเป็น rod-shaped virus และมีเปลือกหุ้ม (envelope) ไวรัสนี้อยู่ในส่วนไซโตพลาสซึมที่ติดกับนิวเคลียสของเซลล์จากเนื้อเยื่อหลายชนิด และยังพบไวรัสที่อยู่เป็นอิสระในที่ว่างระหว่างเซลล์ นอกจากนี้พบว่าเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองยัง

คล้ายคลึงกับ granulosis virus (Baculoviridae) ในแมลงตรงตำแหน่งที่พบในไซโตพลาสซึม ขนาด รูปร่าง และการพัฒนาของไวรัส

จากรายงานของเฟลเกล และฟีแกน (Flegel & Fegan. 1993 : 1-17) เกี่ยวกับโรคหัวเหลืองว่าไม่มีสารเคมีหรือยาใด ๆ รักษาได้ ดังนั้นการหาวิธีการป้องกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่สุด อย่างเช่นไม่ควรใช้อาหารสดในการเลี้ยง และงดการใช้อุปกรณ์ร่วมกันระหว่างบ่อเลี้ยงแต่ละบ่อ เพื่อป้องกันการระบาดของเชื้อ รวมทั้งการจัดสิ่งแวดล้อมที่ดีในระหว่างการเลี้ยงด้วย ส่วนการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคที่เกิดจาก YHV ทำได้เพียงการตรวจวินิจฉัยกุ้งที่ติดเชื้อ โดยตรวจวินิจฉัยฟอ-แม่พันธุ์ และลูกกุ้งวัยอ่อนก่อนนำไปเลี้ยงในฟาร์มโดยใช้วิธี RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

ลู และคณะ (Lu, et al. 1994 : 649-656) ได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้ง 2 ชนิด คือ *Penaeus stylirostris* (blue shrimp) และ *Penaeus vannamei* (white shrimp) ซึ่งเป็นกุ้งที่เลี้ยงกันมากในฮาวาย และประเทศแถบตะวันตก โดยการสกัดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากส่วน cephalothorax tissue ของกุ้งกุลาดำจากประเทศไทยแล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งทั้ง 2 ชนิด พบว่ากุ้งแสดงอาการของโรคตั้งแต่วันที่ 2 หลังจากทำให้ติดเชื้อ (post injection) และตายหมดทั้งสองชนิดในวันที่ 6 อาการของโรคที่พบคือกุ้งมีอาการอ่อนเพลีย ทรงตัวไม่ได้ ไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น เปลือกเป็นสีแดง ไม่พบสีเหลืองของ hepatopancreas และเหงือกเหมือนที่พบในกุ้งกุลาดำ เมื่อศึกษาทาง histopathology พบเซลล์เป็นจำนวนมากตายในส่วน ectodermal tissue และ mesenchymal tissue นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ตรวจจากเซชันของเหงือกและ hepatopancreas พบลักษณะ non-occluded rod-shaped baculo-like virus ขนาด 130-197 X 45-58 nm ซึ่งพบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ จากรายงานนี้สรุปได้ว่ากุ้งทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ในเวลาใกล้เคียงเช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

ลู และคณะ (Lu, et al. 1995 : 67-70) ยังได้รายงานถึงการแพร่กระจายของไวรัสโรคหัวเหลืองตามอวัยวะ และเนื้อเยื่อต่าง ๆ และสามารถบ่งบอกถึงอวัยวะเป้าหมายของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองได้ ทำให้ง่ายที่จะการสกัดและตรวจสอบในเชื้อนี้ได้ โดยนำเนื้อเยื่อและอวัยวะ 9 ส่วนจากกุ้ง *Penaeus vannamei* ที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ได้แก่ส่วนเหงือก ดับ หัวใจ เส้นประสาท เนื้อเยื่อบริเวณหัว กล้ามเนื้อส่วนท้อง ก้านตา อวัยวะน้ำเหลือง และ mid gut นำไปทดสอบโดยวิธี bioassay โดยใช้กุ้ง penaeid เป็นตัวเปรียบเทียบ และทดสอบ quantal assay (TCID₅₀) ใน primary oka จาก cell culture ของกุ้ง พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในทุกเนื้อเยื่อและอวัยวะที่ศึกษา เมื่อนำของเหลวที่ได้จากเนื้อเยื่อและอวัยวะเหล่านี้ไปฉีดให้กุ้ง พบว่ากุ้งทั้งหมดที่ทำการทดสอบตายภายใน 6-9 วัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทดสอบด้วย TCID₅₀ assay กับ primary oka cell culture พบว่า oka เหงือก และ head soft tissue มีปริมาณ (titer) ของไวรัสโรคหัวเหลือง สูงกว่าในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่น ๆ ถึง 10-800 เท่า

ดังนั้นอวัยวะ 3 ส่วนนี้จึงน่าจะเป็นที่มีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองมากที่สุด จึงควรใช้อวัยวะ 3 ส่วนนี้ใช้ในการตรวจสอบและศึกษาเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

จิราพร เกษรจันทร์, กิจการ ศุภมาตร์ และสิทธิ บุญยรัตผลิน (Kasornchandara, Supamattaya & Boonyaratpalin 1995 : 99 -105) ได้ศึกษาขั้นตอนการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสหัวเหลืองในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยการฉีดไวรัสโรคหัวเหลืองเข้าไปในกล้ามเนื้ออกกุ้งกุลาดำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ต่อตัว จำนวน 20 ตัว จากนั้นเก็บอวัยวะน้ำเหลือง หลังการฉีดไวรัสที่เวลา 12 18 24 32 48 และ 56 ชั่วโมง และตรึงใน glutaraldehyde ความเข้มข้น 6.25 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ Sorensen เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการดึ่งน้ำ และสุดท้ายฝังใน Epon - 812 เพื่อตัดเป็นชิ้นเนื้อเยื่อ ย้อมด้วย Uranyl acetate และ lead citrate ผลการตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อเหล่านี้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ตัวอย่างเนื้อเยื่ออกหลังจากที่ฉีดไวรัสไปในชั่วโมงที่ 12 นั้นยังไม่พบอนุภาคของไวรัส ชั่วโมงที่ 18 และ 24 พบการเพิ่มจำนวนอนุภาคของไวรัสซึ่งเกิดขึ้นในนิวเคลียส ชั่วโมงที่ 32 พบการพัฒนาเติบโตเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ จนเกิดการรวมตัวเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ในไซโตพลาสซึม และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 - 56 พบจำนวนอนุภาคไวรัสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีผลทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลายอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้กุ้งกุลาดำนั้นตายภายในเวลา 48 -56 ชั่วโมงหลังการได้รับเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ และคณะ (Wongteerasupaya, et al. 1995 : 45-50) รายงานการวิจัยแยกกรดนิวคลีอิกออกจากเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ เพื่อพิสูจน์ถึงองค์ประกอบที่เป็น DNA สายคู่จากรายงานอื่น ๆ ที่กล่าวไว้ในระยะแรก ซึ่งได้ระบุไว้ว่าไวรัสหัวเหลืองมีแกนกลาง viral core ที่ประกอบด้วย DNA จึงควรจัดไวรัสนี้ให้อยู่ในชนิด granulosis - type baculovirus คณะวิจัยนี้ได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 การทดลอง คือ ได้สกัด DNA จากไวรัสที่มีปริมาณเข้มข้น แต่ปรากฏผลที่ได้นั้นเห็นเพียงแค่ร่องรอยของ DNA ซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้จากการย้อมสี ethidium bromide ในเจลอะกาโรส และหลังจากนั้นได้เลือก recombinant clone จากการนำเอา DNA เหล่านั้นมารวมกัน ก็ยังพบว่าไม่เกิดการจับ hybridize กับ host shrimp DNA และเมื่อทำวิธีทาง *in situ* DNA hybridization พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาใด ๆ กับเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อโรคหัวเหลือง ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อตรวจสอบ negative stain ของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า ไวรัสมีลักษณะต่างไปจาก baculovirus จึงได้ทำการทดลองอีกครั้งโดยการสกัดกรดนิวคลีอิกจากไวรัสหัวเหลืองบริสุทธิ์โดยสังเกตผลที่สกัดออกมาได้เป็น RNA มากกว่าที่จะเป็น DNA จากการเก็บเลือดจากกุ้งทั้งหมด 200 ตัว ที่ได้รับการฉีดให้เหี่ยวตายด้วยไวรัสโรคหัวเหลืองจนกุ้งแสดงอาการถึงระยะสุดท้ายของโรค นำไปผ่านการปั่นในแบบ Urografingradient ultracentrifugation จากความเข้มข้น 22 เปอร์เซ็นต์ถึงความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในบริเวณความเข้มข้นที่ 30 ถึง 37 เปอร์เซ็นต์ให้ผลที่สะอาดและมีปริมาณอนุภาคไวรัสมากที่สุด เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน พบไวรัสมีรูปร่าง

เป็นแท่ง มีชั้นเนื้อเยื่อห่อหุ้ม ขนาด 150 - 170 X 40 - 50 นาโนเมตร มีปุ่มปลมความยาว 11 นาโนเมตร ยื่นออกมาโดยรอบ ส่วนกรดนิวคลีอิกที่ได้จากการสกัดด้วยสาร guanidium thiocyanate และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย CsCl gradient ultracentrifugation จะได้เป็นกรดนิวคลีอิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและพบว่าสามารถทำให้ลดขนาดลงได้ด้วย Rnase - A มิใช่ Dnase I และเมื่อสังเกตลักษณะของ negatively stained virion และลักษณะ RNA ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน สามารถสรุปได้ว่า เชื้อไวรัสหัวเหลืองมีความคล้ายคลึงกับไวรัสชนิด rhabdovirus หรือ coronavirus มากกว่า baculovirus

นาดาลา, ทาเปย์ และโลห์ (Nadala, Tapay & Loh. 1997 : 141-146) รายงานว่า yellow-head virus (YHV) เป็นไวรัสที่มีความรุนแรงสูงต่อกุ้ง panaeid เพาะเลี้ยง ซึ่งไวรัสนี้แยกได้มาจากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* จากประเทศไทย โดยในระยะแรกรายงานว่าเป็นไวรัสประเภท baculovirus แต่เพ่งมีการรายงานขัดแย้งว่าเป็นไวรัสที่มี RNA เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการวิจัย โดยได้ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากกุ้งที่ติดเชื้อโรคหัวเหลือง จากการเหนี่ยวนำด้วยการฉีดเชื้อไวรัสปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จาก 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักตัวส่วนด้วยปริมาตรที่ได้จากการเตรียมด้วยอวัยวะส่วนเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ทำการเก็บตัวอย่างใน 3 - 4 วัน และหลังจากนั้นเตรียมเชื้อที่ได้จากส่วนเหงือก เนื้อเยื่อส่วนหัว และเลือด ทำการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยวิธี SDS-PAGE analysis พบโครงสร้างโปรตีนอย่างน้อย 4 โครงสร้าง โดยมีน้ำหนักโมเลกุลที่ 170 135 67 และ 22 กิโลดาลตัน และทำการตรวจสอบโดยวิธี western blot โดยใช้ polyclonal anti - YHV IgG พบการเกิดแถบทั้งหมด 4 แถบ โดยที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 135 กิโลดาลตัน มีความเข้มข้นสูงที่สุดและเกิดปฏิกิริยากับ anti - YHV antibodies ขณะที่ anti - YHV IgG นี้ ไม่ทำปฏิกิริยากับโครงสร้างโปรตีนของไวรัสตัวอื่นที่นำมาทดสอบร่วมด้วย อันได้แก่ rhabdovirus of panaeid shrimp (RPS) และ vesicular stomatitis virus (VSV) นอกจากนี้ยังตรวจสอบพบว่าที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 135 กิโลดาลตัน เป็นสารจำพวก glycosylate จากการทดสอบด้วย Glycoprotein labeling

นอกจากนี้ยังยืนยันผลว่าเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง หรือ yellow - head virus เป็น unsegment single - strand RNA ที่เป็นสายลบ ขนาดประมาณ 22 คู่เบส จากการที่ตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ RNase พบว่า แถบ RNA ที่ 22 คู่เบส ยอมรับการย่อยสลายเนื่องจากการใช้เอนไซม์ RNase และในการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบอนุภาค YHV ที่มีเยื่อหุ้ม มีลักษณะเป็น bacilliform วัดขนาดได้ประมาณ 50-60 x 190-200 นาโนเมตร ด้านในประกอบด้วย helical nucleocapsid ติดกับเยื่อหุ้มและมีสาย peplomer หรือปุ่มหนาม ยื่นออกโดยรอบ อนุภาคมีความยืดหยุ่นสูงซึ่งสังเกตจากการพบรูปร่างอนุภาคต่าง ๆ ออกไปเป็นจำนวนมากและบางกลุ่มมีการถูกทำลายซึ่งอาจเนื่องจากโครงสร้างแตกหักได้ง่ายเช่นกัน การทดลองสุดท้ายได้นำ yellow - head virus (YHV) และ vesicular stomatitis virus (VSV) ไปทดลองการจับตัวของเม็ดเลือด

hemagglutination ที่ได้จากไก่ พบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดจับตัวกับเซลล์เม็ดเลือดทำปฏิกิริยากันแน่น ไม่หลุดออกนานเกิน 24 ชั่วโมง จึงสรุปได้ว่าไวรัสไม่มี receptor ในการทำลายของเอนไซม์ และสุดท้ายให้ข้อสรุปว่าเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง หรือ yellow – head virus มีคุณสมบัติต่าง ๆ เหมือนในไวรัสประเภท rhabdovirus จึงน่าจะจัดอยู่ใน rhabdovirus จนกว่าจะได้ข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติมมากกว่านี้

นูนาน, พอลอส และไลท์เนอร์ (Nunan, Poulos & Lightner. 1998 : 19-30) ทำการวิจัยเนื่องจากเห็นว่าการส่งผ่านเชื้อโรคข้ามประเทศเกิดขึ้นบ่อยครั้ง ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากการโยกย้ายคน สัตว์ หรือสิ่งของต่างๆ โดยอาจปนเปื้อนมาทางพื้นดิน น้ำทะเล ทางอากาศ หรือทางเรือ ตัวอย่างเช่นการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง จึงทำการวิจัยตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV) จากผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งที่นำเข้าสหรัฐอเมริกา มาจากทางแถบประเทศในเอเชีย โดยทำการทดลองการนำสารที่สกัดมาจากกุ้งกุลาดำแช่แข็ง *P. monodon* ที่แสดงอาการดวงขาวบริเวณหางมาฉีดให้แก่กุ้งทดลอง *P. stylirostris* ซึ่งเป็นกุ้งที่เลี้ยงภายในประเทศสหรัฐอเมริกา ผลที่ได้พบการตายสะสมถึง 100 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 8 วัน เมื่อนำกุ้งทดลองมาตรวจสอบทาง bioassay และ histopathology ผ่านกล้องจุลทรรศน์ แสงธรรมดาดพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองอย่างรุนแรง มีการตายของเซลล์และลักษณะนิวเคลียสที่พบเกิด karyorhexis และ pyknosis ในส่วนอวัยวะที่ได้รับผลกระทบจากไวรัสนั้นก็คือ อวัยวะน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เซลล์พิลลา (pillar) เซลล์เยื่อบุผิวของส่วนเหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นเนื้อเยื่อยึดใต้ต่อผิวหนัง กล้ามเนื้อ ทางเดินอาหาร antennal gland อวัยวะสืบพันธุ์ เส้นประสาท และปมประสาท และเมื่อตรวจลักษณะไวรัส พบอนุภาคไวรัสขนาดใหญ่มีหนามปุ่มปมยื่นออกมาจากเยื่อหุ้ม วัดความยาวอนุภาคไวรัสขนาดใหญ่ได้ 155 - 210 นาโนเมตร (โดยเฉลี่ย 170 นาโนเมตร) เส้นผ่านศูนย์กลาง 26 - 54 นาโนเมตร (โดยเฉลี่ย 38 นาโนเมตร) ส่วนผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR แสดงถึงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย ซึ่งผลการศึกษานี้ บ่งชี้ความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดส่งผ่านไวรัส YHV และ WSSV จากการนำเข้ากุ้งที่มีเชื้อดังกล่าวจากแถบประเทศเอเชียมาสู่ประเทศสหรัฐอเมริกา เพราะเนื่องจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ความเป็นจริงนั้นแล้วจะพบแค่ในแถบประเทศทางตะวันออก แต่ขณะนี้ได้พบการระบาดของเชื้อตัวแดงดวงขาวในประเทศสหรัฐอเมริกา

แทงก์ และไลท์เนอร์ (Tang & Lightner 1999) ทำการวิจัยโดยเตรียมโคลนจาก cDNA ของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเพื่อนำไปเป็นตัวตรวจสอบในเทคนิค *in situ* hybridization โดยชิ้นส่วน cDNA นั้นมีขนาด 1161 คู่เบส ตั้งชื่อโคลนว่า 3-27 นำมาติดฉลากด้วย digoxigenin แล้วใช้ในเทคนิค *in situ* hybridization ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อของกุ้ง *Penaeus vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง พบว่าเกิดปฏิกิริยาผลบวกกับเนื้อเยื่อรวมไปถึงอวัยวะน้ำเหลือง ชั้นผิวหนังชั้นนอก และเหงือก นอกจากนั้นยังมี เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับอ่อน หัวใจ antennal gland อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เส้นประสาท ลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง และกล้ามเนื้อ ที่

เกิดปฏิกิริยากับตัวตรวจสอบ ตัวตรวจสอบนี้มีความจำเพาะสูงกับเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เนื่องจากไม่ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อที่ไม่มีเชื้อไวรัส หรือเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นเช่น ไวรัสตัวแดงดวงขาว IHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus) หรือ TSV (Taura Syndrome virus) เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนและสังเคราะห์ไพรเมอร์ จะสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากตัวอย่างเลือดได้จากเทคนิค RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) ดังนั้น สายstrand ที่สามารถสร้างเป็นลำดับ cDNA นั้นได้จากการใช้เทคนิค RT-PCR และ *in situ* hybridization โดยมีตัวตรวจสอบเป็น RNA สายเดี่ยว (ssRNA)

โคว์เลย์ และคณะ (Cowley, et al. 1999) ได้ทำการเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อไวรัสหัวเหลือง หรือ yellow - head virus (YHV) จากประเทศไทย และ gill - associated virus (GAV) จากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งใช้วิธีการตรวจสอบทาง RT-PCR และการวิเคราะห์ลำดับ (sequence analysis) โดยได้กำหนดลำดับ PCR primer จากส่วน ORF1b polyprotein gene ของเชื้อไวรัส GAV พบว่ามีความสัมพันธ์ตรงกันกับลำดับจีโนม ของเชื้อไวรัส YHV ทั้งหมด 577 นิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบจากบริเวณที่เกิดการเพิ่มขึ้น (amplify) ในลำดับที่ตรงกัน ของส่วนนิวคลีโอไทด์ มีประมาณ 85.1 เปอร์เซ็นต์ และส่วนลำดับกรดอะมิโน มีประมาณ 95.8 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเปรียบเทียบการรายงานผลของคณะวิจัยอื่นก่อนหน้านี้ซึ่ง ได้กำหนด YHV PCR primer ในการเพิ่มผลผลิต ได้ผลผลิต 135 นิวคลีโอไทด์ เมื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองพบว่าไม่สามารถเพิ่มผลผลิตที่ตรงกันกับเชื้อไวรัส GAV ได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยอื่นที่ทำการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัส GAV และ YHV ตรงบริเวณเหนือขึ้นไปจากยีน ORF1b พบว่าในส่วนระดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันถึง 83 และ 80.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ระดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกัน 89.7 และ 86.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัส gill - associated virus และ yellow - head virus มีความคล้ายคลึงกันแต่เป็นไวรัสคนละชนิดซึ่งสามารถพัฒนาตัวตรวจสอบตรวจจากความต่างกันได้

นุสรา สิทธิดิolkรัตน์ และคณะ (Sittidilokratana, et al. 2002 : 87-93) ทำการวิจัยถึงลำดับของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 8503 นิวคลีโอไทด์ในบริเวณจีโนมของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่มีส่วนของตำแหน่งยีน ORF 1b โดยเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับจีโนมของไวรัส gill - associated virus (GAV) พบว่ามีจีโนมลักษณะเดียวกันกับไวรัสหัวเหลืองประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และไวรัสหัวเหลืองมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับไวรัส gill-associated virus ถึง 88.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าไวรัสหัวเหลืองมีสารจำพวก polymerase , metal ion binding , helicase และ domain อื่น ๆ จากการพิจารณาคูสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้จึงเห็นพ้องว่า ไวรัสหัวเหลืองจัดอยู่ไวรัสจำพวก genus nidovirus และข้อมูลจากการตรวจสอบทางพันธุกรรมของการเรียงตัวในลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นพบว่าไวรัสหัวเหลืองควรจัดอยู่ใน order Nidovirales และจาก

หลักฐานทางชีววิทยาและการวิเคราะห์จากตำแหน่งต่าง ๆ ที่ไวรัสอยู่ในเซลล์ จึงทำให้ทราบว่า YHV และ GAV นั้นไม่ได้เป็นชนิดเดียวกัน

กรณีการ ขนบดี และคณะ (Khanobdee, et al. 2002 : 79-90) ทำการศึกษาการเกิด apoptosis ในกุ้งที่เป็นผลมาจากการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง yellow - head virus (YHV) ซึ่งได้ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงทาง histological cytochemical และ ultrastructure จากส่วนของเม็ดเลือด อวัยวะน้ำเหลือง และส่วนเหงือก ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ในหลายช่วงเวลาหลังจากฉีดเหี่ยวนำด้วยไวรัสโรคหัวเหลือง พบกุ้งเริ่มแสดงอาการป่วยให้เห็นเป็นระยะต่อมาเริ่มจากที่ชั่วโมงที่ 36 เมื่อย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยฮีมาทอกซาลิน และอีโอซิน สังเกตเห็นในทั้ง 3 เนื้อเยื่อดังกล่าวมีการเพิ่มความหนาแน่นของนิวเคลียส , pyknosis และ karyorrhexis หลังจากฉีดไปแล้ว 36 ชั่วโมง จนกุ้งตาย แต่อย่างไรก็ตามในกุ้งบางตัวแสดงอาการของโรคให้เห็นและตรวจพบไวรัสในอวัยวะน้ำเหลือง ได้ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีดเหี่ยวนำด้วยไวรัส จากนั้นได้ทำการทดลองย้อม DNA ด้วย สาร 4',6 - diamidino - 2 phenylindole (DAPI) และติดฉลากอย่างจำเพาะด้วย 3' - OH ends of nuclear DNA โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated deoxy - UTP nick - end labeling (TUNEL) โดยเซลล์ของทั้ง 3 เนื้อเยื่อแสดงถึงโครมาตินที่หนาแน่นและ DNA มีการแตกหักตามลำดับ ซึ่งสันนิษฐานว่าทั้ง 2 เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นมาจากการเกิด apoptosis ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการเกิด apoptosis นอกจากนี้จากการติดฉลากของเทคนิค TUNEL นั้น ทำให้สามารถเห็นการแตกของ DNA ประมาณ 200 คู่เบส ในตัวอย่างเลือด ที่เวลาชั่วโมงที่ 48 หลังการฉีดเหี่ยวนำเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง แต่ไม่สามารถเห็นในกุ้งที่ไม่เกิดการติดเชื้อ เมื่อตรวจสอบอวัยวะน้ำเหลือง ด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จะเห็นการเกิด apoptosis ในเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ รวมไปถึงการเกิดภาวะอักเสบ การรวมกันหนาแน่นและแตกตัวของโครมาติน โดยไม่มีการทำลายส่วนของไซโตพลาสซึม และจากข้อมูลที่ตรวจสอบอันได้แก่ ข้อมูลทาง histology cytochemistry ultrastructure และ biochemistry พบว่าตรงกับสมมติฐานว่าการแพร่กระจายและการขยายตัวของเหตุการณ์ apoptosis เกิดขึ้นกับกุ้งที่มีความอ่อนแอโดยเนื่องจากได้รับเชื้อโรคไวรัสโรคหัวเหลือง แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการตรวจสอบที่สามารถระบุได้ว่าการเกิด apoptosis นั้นเป็นสาเหตุทำให้เกิดอันตรายและก่อให้เกิดอาการป่วยในกุ้ง โดยเพิ่มความเสื่อมของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในได้แก่ เม็ดเลือด เหงือก และ อวัยวะน้ำเหลือง มีผลทำให้การทำงานของร่างกายอยู่ในภาวะอันตราย และมีอาการภายนอกให้เห็นเช่นการเชื่องซึม อ่อนแอ ระบบการทำงานของร่างกายในเสียหาย และตายในที่สุด

การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

ลู, ทาเปย์ และโลห์ (Lu, Tapay & Loh 1996 : 9 -13) พัฒนาเทคนิค nitrocellulose enzyme - immunoassay (NC-EIA) ขึ้นเพื่อตรวจสอบกึ่งที่คาดว่าได้รับเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง โดยในการวิจัยนี้ได้ใช้แอนติบอดีแรก เป็น polyclonal hyperimmune IgG และใช้แอนติบอดีตัวที่ 2 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) ส่วนแอนติเจนนั้นได้ใช้เชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากส่วนเหงือกและส่วนหัว cephalothorax ของกึ่ง *P.vannamei* ที่ได้รับเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง จากผลการทดลองเมื่อใช้สับสเตรตเป็น TMB จะให้ผลที่ชัดเจน สังเกตได้ด้วยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นให้สีฟ้า ถึงแม้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีเพียงเล็กน้อย แต่ในสับสเตรตจาก DAB จะให้ผลจากปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลซึ่งลักษณะสังเกตได้ยาก และ เมื่อจะทำให้เกิดปฏิกิริยาโดย DAB นั้น จะต้องใช้ปริมาณโปรตีนโมเลกุลของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองถึง 0.8 นาโนเมตร ส่วนในการทดสอบความไวของการเข้าทำปฏิกิริยาในเทคนิค NC-EIA นี้ สามารถตรวจพบไวรัสโรคหัวเหลืองในปริมาณไวรัสเพียงแค่ 100 TCID₅₀ เท่านั้น ส่วนของการใช้วิธีต่าง ๆ ของกึ่งที่ติดเชื่อนั้น ผลที่ได้พบว่าแอนติเจนที่มาจากเซลล์เหงือกให้ผลการตรวจจากวิธีการ NC-EIA ได้ดีที่สุด และยังแนะนำให้ใช้เซลล์เหงือกเป็นแอนติเจนเนื่องจากเป็นส่วนที่เตรียมได้ง่ายกว่าวิธีอื่นที่เป็นเป้าหมายสำคัญของไวรัสโรคหัวเหลือง

นาดาลา และคณะ (Nadala, et al. 1997 : 39-44) ทำการวิจัยเพื่อพัฒนาเทคนิค Western Blot (WB) มาใช้ในการตรวจไวรัสในกึ่ง ซึ่งได้แก่ yellow - head virus (YHV) และ chinese baculovirus (CBV) โดยขั้นตอนการทำการทดลองนั้น นำกึ่ง *Penaeus vannamei* นำมาเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อไวรัส ด้วยการฉีดไวรัสที่ได้จากสารสกัดเนื้อเยื่อส่วนหัวของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัส YHV และ CBV แล้วจากนั้นนำเลือดมาตรวจด้วยวิธี Western Blot โดยใช้ขั้นตอนของ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis รวมอยู่ด้วย สามารถแยกโปรตีน G มีน้ำหนักโมเลกุล 135 กิโลดาลตัน และ โปรตีน L มีน้ำหนักโมเลกุล 170 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสโรคหัวเหลืองได้อย่างชัดเจนที่เวลา 64 ชั่วโมงหลังจากฉีดไวรัสเหนี่ยวนำ ส่วนในการตรวจสอบเชื้อไวรัส CBV ผลที่เกิดให้ลักษณะแถบ nucleocapsid ของไวรัส เกิดขึ้นทั้งหมด 3 แถบที่เวลา 41 และ 43 ชั่วโมงหลังการฉีดไวรัสเหนี่ยวนำ โดยในขณะนั้นกึ่งทดลองยังไม่แสดงอาการป่วยจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 จึงจะสังเกตอาการได้ และนอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองใช้วิธี Western Blot ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออวัยวะน้ำเหลืองซึ่งสามารถแสดงผลภายในระยะเวลา 4 วันหลังการติดเชื้อ โดยผลที่ปรากฏนั้นเป็นผลของ gel electrophoresis รูปแบบลักษณะเดียวกันกับการตรวจจากเลือด ผลสรุปข้อดีของเทคนิค Western Blot นั่นคือให้ความแม่นยำ รวดเร็ว และไวต่อปริมาณไวรัสที่

ยังไม่ถึงขนาดที่จะทำให้กุ้งเกิดอาการของโรคและในการตรวจสอบเลือดทำได้โดยสัตว์ทดลองไม่เสียชีวิต

ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ และคณะ (Wongteerasupaya, et al. 1997 : 81-186) ได้พัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ให้มีความแม่นยำ รวดเร็วและสะดวกมากยิ่งขึ้น โดยเตรียมตัวตรวจสอบกรดนิวคลีอิกที่ได้จาก cDNA ซึ่งสกัดจาก ssRNA ของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ตัวตรวจสอบที่มีความจำเพาะนี้สร้างขึ้นได้จากการใช้เทคนิค dot - blot hybridization กับกรดนิวคลีอิกที่ได้จากเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ในกุ้ง, แบคทีเรีย หรือไวรัสอื่น จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ให้ใช้กับปฏิกิริยา RT-PCR ที่ขนาด 135 เบสเพื่อใช้ในการตรวจสอบ RNA ของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เมื่อนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR กับตัวต้นแบบของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสและเชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์ หรือกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง จึงทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาด 135 เบสตามที่คาดหมายในทางตรงข้าม การทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิกของกุ้งปกติหรือกุ้งที่มีเชื้อโรคอื่น ๆ นั้นไม่ให้ผลผลิตใดๆ ซึ่งผลที่ออกมาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความแม่นยำในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ RNA ของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง นอกจากนี้ เทคนิค RT-PCR มีความไวสูงเพราะเนื่องสามารถตรวจได้แม้ใน RNA ปริมาณเพียงเล็กน้อยแค่ 0.01 พิโคกรัม และในแง่ของความเร็วนั้นเทคนิคนี้สามารถตรวจเจอเชื้อไวรัสในเวลาแค่เพียง 6 ถึง 12 ชั่วโมง แต่ในขณะที่เทคนิคของ histopathology จะเห็นผลได้นั้นต้องใช้เวลาตรวจสอบหลังการติดเชื้อ 42 ถึง 48 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นเทคนิค RT-PCR อาจมีประโยชน์ในการตรวจสอบการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองได้ในระยะแรกที่กุ้งได้รับเชื้อก่อนที่จะเกิดอาการป่วย แต่อย่างไรก็ตาม ในแง่ปฏิบัติและค่าใช้จ่ายที่สูงอาจเป็นอุปสรรคในการที่จะนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการปฏิบัติจริง

นาดาลา และโลห์ (Nadala & Loh 2000 : 175 -179) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อ white -spot syndrome virus (WSV) และ yellow - head virus (YHV) ในกุ้ง โดยวิธี dot -blot nitrocellulose enzyme immunoassay (DB - NC - EIA) การทดลองได้นำชิ้นเหงือกของตัวอย่างกุ้ง *Penaeus vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัส WSV และ YHV มาทดสอบ โดยเชื้อที่คัดแยกมาเหนี่ยวนำนั้นได้จากประเทศต่าง ๆ ได้แก่ จีน อินโดนีเซีย และสหรัฐอเมริกา ในประเทศญี่ปุ่นนั้นได้คัดเชื้อแยกมาจากฟาร์มของกุ้ง *Penaeus japonicus* จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดที่ได้ หยดลงบนแผ่น nitrocellulose membrane (NC) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ต่อหนึ่งหยด แล้วถ่ายลงบน polystyrene tube บ่มด้วยสารละลาย blocking ซึ่งเป็นนมผงพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และให้ทำปฏิกิริยากับ anti - WSV IgG - HRP และ anti - YHV IgG - HRP ซึ่งผลิตได้จากกระต่าย ทั้งหมด 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงอ่านผลหลังจากให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรต TMB (3,3',5,5' - tetramethylbezidine) เป็นเวลา 3 นาที พบว่า blot ของตัวอย่างเหงือกกุ้งที่ติดเชือบนแถบเซลลูโลส ทั้ง WSV และ YHV แบบเจือจาง 1 : 10 และ

ไม่ได้เจอจาง ไม่เห็นผลในตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง anti - WSV IgG - HRP กับตัวอย่างเหงือกกุ้งที่ติดเชื้อ YHV และในทางกลับก็ไม่เกิดปฏิกิริยา ระหว่าง anti - YHV IgG - HRP กับตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อ WSV เช่นกัน และการทดสอบในกุ้งที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสที่คัดแยกจากประเทศอื่น ๆ นั้น ผลที่ได้เป็นบวกทั้งหมด ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า การใช้เทคนิค dot - blot nitrocellulose enzyme immunoassay (DB - NC - EIA) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ white - spot syndrome virus และ yellow - head virus มีความแม่นยำไว และง่าย ทราบผลเพียงแค่ว่าภายในเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งจากผลที่ได้แสดงถึงความไวต่อปฏิกิริยาในขณะที่ได้เจอจางตัวอย่างไป 10 เท่า ซึ่งเท่ากับว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกุ้งได้ในขณะที่กุ้งนั้นเพิ่งได้รับเชื้อและยังไม่แสดงอาการ

โคว์เลย์ และคณะ (Cowley, et al. 2000 : 159 -167) ได้นำวิธี reverse transcription ที่มีความไวในการตรวจสอบสูง ที่เรียกว่า nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) มาตรวจสอบการติดโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* จากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งได้แก่โรค yellow-head-like viruses, gill-associated virus (GAV) และ lymphoid organ virus (LOV) จากการทดลองพบว่า เทคนิค RT-nPCR นั้นสามารถตรวจ RNA ในไวรัส GAV ในจำนวนเพียงแค่ 10 พิโคกรัม จากปริมาณ RNA ที่สกัดได้จากอวัยวะน้ำเหลืองในกุ้งกุลาดำ และสามารถเพิ่มจำนวนชุดโคลน cDNA ของเชื้อ GAV ซึ่งแสดงให้เห็นถึง nested PCR มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะตรวจสอบจีโนมโดยใช้ DNA ต้นแบบ นอกจากนี้ในการทดลองยังได้แสดงผลของ RT - nPCR ในแง่ของความจำเพาะและความไวสูงต่อการตรวจสอบการติดเชื้อ GAV ในกุ้ง *Penaeus japonicus* โดยลำดับจีโนมเชื้อไวรัส GAV สามารถทำการเพิ่มจำนวน RNA ในส่วนที่มาจากอวัยวะน้ำเหลือง และเม็ดเลือดที่เวลา 6 ชั่วโมง และจากเหงือกที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการฉีดเหนี่ยวนำเชื้อไวรัสในกุ้ง แต่จากการสังเกตจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบส่วนของ nucleocapsid และ อนุภาคไวรัสในเซลล์อวัยวะน้ำเหลือง และเซลล์เม็ดเลือดตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 6 หลังการฉีดเชื้อไวรัสเหนี่ยวนำตามลำดับ ขณะที่ไม่พบการติดเชื้อในเซลล์เหงือก นอกจากนี้ได้ทำการทดลองนำเทคนิค RT-nPCR มาใช้คัดแยกกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ปกติไม่เป็นโรคจากการจับจากธรรมชาติ โดยผลพบว่าส่วนใหญ่กุ้งที่ตรวจนั้นมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ของกุ้งทั้งหมด ให้เป็นผลบวก ซึ่งอาจเนื่องมาจาก ตรวจพบเชื้อไวรัส LOV ซึ่งเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นเชื้อไวรัสที่ไม่ก่ออันตรายซึ่งแปรผันไปจากเชื้อไวรัส GAV และเชื้อไวรัส LOV เป็นเชื้อที่พบเป็นปกติโดยเฉพาะในแถบบริเวณรัฐควีนส์แลนด์เหนือ ประเทศออสเตรเลีย สุดท้าย ได้เสนอแนะการนำอวัยวะน้ำเหลืองมาใช้ทดสอบจาก RNA ซึ่งได้แก่ ส่วนของอวัยวะน้ำเหลือง, เหงือก และเม็ดเลือด นั้น ควรที่จะใช้ส่วนของเนื้อเยื่อชิ้นเหงือกเล็กๆมาตรวจ เนื่องจากไม่ต้องทำให้สัตว์ทดลองนั้นตาย จากการทดลองจึงสามารถสรุปได้ถึงประโยชน์ในการนำเทคนิค RT - nPCR มาตรวจสอบไวรัส LOV และ GAV ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*

ได้ โดยไม่ต้องนำวิธีตรวจด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านมาใช้ร่วมด้วยและยังให้ประโยชน์ในการคัดเลือกกุ้งที่จะนำมาเพาะพันธุ์โดยปราศจากเชื้อไวรัส LOV

ไพศาล สิทธิกรกุล และคณะ (Sithigorngul, et al. 2000 : 27-34) สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสโรคหัวเหลือง จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดจากเหงือกของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ได้รับเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และ WSSV คือ V3-2B ซึ่งเป็นโคลนที่มีความจำเพาะต่อไวรัสโรคหัวเหลืองซึ่งสามารถจับกับไวรัสโรคหัวเหลืองได้ทั้ง native antigen และ SDS-treated viral specific antigen จากการศึกษาเหงือกกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสด้วยวิธี immunocytochemistry พบว่าไวรัสกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อเหงือก และเซลล์ตับ (hepatocytes) และไม่พบการจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนในเลือดกุ้งปกติ จากการศึกษาด้วยวิธี immunocytochemistry ของเนื้อเยื่อกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง พบว่าให้ผลบวกกับปฏิกิริยาดังกล่าว ขณะที่เนื้อเยื่อของกุ้งกลุ่มควบคุมหรือกุ้งปกติจะไม่ให้ผลกับปฏิกิริยานี้ และจากการวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis พบว่าแอนติบอดีทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 135 KD ซึ่งโปรตีนชนิดนี้พบเฉพาะในกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เท่านั้น ส่วนการศึกษาด้วยเทคนิค dot blot indirect immunoperoxidase assay พบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถตรวจสอบไวรัสโรคหัวเหลือง ที่อยู่ในเลือดที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้ถึงอัตราการเจือจางเป็น 1:1000 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้ จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งอย่างรุนแรง และไม่รุนแรง

ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองนั้นจะเห็นว่านักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้ศึกษาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว และแม่นยำสูง วิธีการสามารถกระทำได้ง่าย ทราบผลได้รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายต่ำ ไม่ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญหรือเชี่ยวชาญโดยเฉพาะ การใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันเพื่อการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองกระทำได้โดยการผลิตแอนติซีรัที่มี ความจำเพาะต่อไวรัสโรคหัวเหลือง (Lu, Tapay & Loh 1996 : 9 -13) ; (Nadala, et al. 1997: 39-44) ; (Nadala & Loh. 2000 : 175-179) ; (Sithigorngul, et al. 2000 : 27-34) ; (Sithigorngul, et al. 2002 : 71-76)

พาหะของโรคไวรัสหัวเหลือง

การศึกษาถึงความเป็นพาหะของโรคไวรัสโรคหัวเหลืองในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ส่วนใหญ่มีรายงานเฉพาะเชื้อ WSSV โดยมีผู้วิจัยเกี่ยวกับการเป็นพาหะดังนี้

โล และคณะ (Lo, et al. 1996 : 215-225) พัฒนา 1 step PCR และ 2 step nested PCR พบการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กุ้ง kuruma *Penaeus japonicus* กุ้งหางแดง *Penaeus penicillatus* กุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* และในปูทะเล *Scylla serrata* จากบ่อเลี้ยง พบว่าบางส่วนมีการติดเชื้อ WSSV ตามธรรมชาติอยู่แล้ว นอกจากนี้ยังตรวจพบการติดเชื้อ WSSV ในครัสตาเซียนอื่น ๆ ที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ปูกางเขน *Charybdis feriatus* ปูม้า *Portunus pelagius* ปูสามจุด *Portunus sanguinolentus* ไรน้ำกลุ่ม copepod *Helice tridens* และ กุ้งในวงศ์ Palaemonidae ชนิดต่าง ๆ ซึ่งครัสตาเซียนเหล่านี้ คาดว่าน่าจะเป็นแหล่งสะสมเชื้อ WSSV ให้กุ้งที่เพาะเลี้ยงได้

นอกจากนี้ โล และคณะ (Lo, et al. 1996 : 215-225) ยังพบว่าเชื้อ WSSV สามารถถ่ายทอดไปในกุ้งได้หลายชนิดและพบได้ในหลายประเทศทั่วเอเชีย ในการตรวจพบเชื้อ WSSV ในกุ้งนี้ได้ใช้วิธี 1-step PCR reaction และยังสามารถพัฒนาไปเป็น 2-step PCR ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบวินิจฉัยที่สูงยิ่งขึ้นไปอีกโดยประมาณ 10^3 ถึง 10^4 เท่าเมื่อเทียบกับวิธี 1-step PCR โดยเทคนิคทั้งสองนี้ได้นำมาใช้ตรวจหา DNA ของ WSSV ในกุ้งที่เพาะเลี้ยงและกุ้งจากธรรมชาติ รวมถึงสัตว์จำพวกปูและอาร์โทรพอดอื่นๆ ซึ่งผลที่ได้ พบกุ้งเพาะเลี้ยงได้แก่กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กุ้งครูมา *Metapenaeus japonicus* กุ้งหางแดง *Penaeus penicillatus* และกุ้งตะกาด *Metapenaeus ensis* ที่เพาะจากแหล่งต่าง ๆ กันนั้นติดเชื้อ WSSV เมื่อวิเคราะห์ DNA ที่สกัดจากกุ้งที่รวบรวมได้ด้วยวิธี 1-step PCR พบว่าให้ชิ้นส่วนยีน 1447 PCR ส่วนตัวอย่างในปูทะเล *Scylla serrata* พบการติดเชื้อ WSSV ที่ 1-step PCR ส่วนในบางกลุ่มที่เหลือให้ผลของ 2-step PCR และนอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ผลการตรวจ DNA ในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ที่มีอาการโรคตัวแดงดวงขาวได้ผลบวกใน 2-step PCR เช่นเดียวกัน และสุดท้ายผลการทดลองยังได้ยืนยันการมีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในธรรมชาติจากกุ้งที่จับมาอันได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งครูมา กุ้งหางแดงและปูต่าง ๆ ได้แก่ ปูกางเขน *Charybolis feriatus* ปูม้า *Portunus pelegicus* และปูสามจุด *P. sanguinolentus* ทั้งหมดที่รวบรวมได้จากแถบชายฝั่งทะเลทางประเทศไต้หวัน นอกจากนี้ยังตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในอาร์โทรพอดที่มีอยู่ในฟาร์มกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV พบว่าไรน้ำกลุ่ม copepod pest crab *Helice tridens* ,small pest ของกุ้งครอบครัว Palaemonidae และตัวอ่อนของแมลงจำพวก Ephydriidae เป็นแหล่งสะสมเชื้อ WSSV โดยอาจถ่ายทอดเชื้อสู่ฟาร์มกุ้งกุลาดำได้

ปานันท์ กาญจนภูมิ และคณะ (Kanchanaphum, et al. 1998 : 1-7) ทำการวิจัยศึกษาถึงความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อ WSSV ของปู 3 ชนิด ได้แก่ *Sesarma* sp., ปูทะเล

Scylla serrata และ ปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ไปสู่กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยการทดลองเหี่ยวนำเชื้อ WSSV โดยการฉีดให้แก่ปูทดลองทั้งหมด ผลที่ได้พบว่า สัตว์ทดลองสามารถทนต่อไวรัสโดยไม่มีอาการของโรคปรากฏให้เห็นหรือมีการตายเกิดขึ้นตลอดช่วง 45 วันของการทดลอง ซึ่งขั้นตอนนี้ตรวจสอบด้วยผลของ histology , specific *in situ* DNA hybridization และเทคนิคทาง PCR หลังจากนั้นนำเอาปูทั้งหมดที่มีเชื้อไวรัสไปเลี้ยงรวมกันกับกุ้งกุลาดำ *P.monodon* ที่ปกติ พบการถ่ายทอดไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำได้ โดยผ่านทางน้ำที่เลี้ยงอยู่ในบ่อเดียวกัน การถ่ายทอดไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำตรวจพบได้ด้วยวิธี *in situ* hybridization และเทคนิค PCR หลังจากที้นำไปเลี้ยงรวมกันรวมทั้งหมด 12 ชั่วโมง สำหรับปูทะเล *Scylla serrata* เกิดการถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำได้ ซึ่งตรวจพบโดยเทคนิค PCR หลังระยะเวลาที่อยู่ร่วมกัน 24 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 60 ชั่วโมง ในปูทะเล *Scylla serrata* ตรวจจากเทคนิค PCR พบที่เวลา 48 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 60 ชั่วโมง และในปูแสม *Sesarma* sp. ตรวจจากเทคนิค PCR พบที่เวลา 48 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษา เป็นการจำลองสถานการณ์ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากพาหะนำโรคไปสู่กุ้งกุลาดำซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในบ่อกุ้ง อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้มีปัจจัยของจำนวนสัตว์ทดลองที่น้อยกว่าจริงและน้ำทะเลที่ใช้ในนั้นมีความสะอาดกว่าบ่อเลี้ยงสภาพจริง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลทำให้อัตราการถ่ายทอดของเชื้อไวรัสนั้นเปลี่ยนแปลงไป จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษากันต่อไปถึงปัจจัยของขนาดบ่อเพาะเลี้ยง คุณภาพน้ำ และพฤติกรรมการอยู่ร่วมกันในบ่อกุ้งที่เป็นสถานที่จริง

กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (Supamattaya, et al. 1998 : 1-7) ใช้เทคนิค PCR และ *in situ* hybridization ในการตรวจการติดเชื้อในครัสตาเซียน 3 ชนิด คือ กุ้งเคย *Acetes* sp. ปูม้า *Portunus pelagicus* และปูทะเล *Scylla serrata* ที่ได้รับเชื้อ WSSV โดยการให้กินเนื้อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ WSSV ส่วนการฉีด และการแช่หรือจุ่มด้วยสารสกัดไวรัสจากเนื้อเยื่อที่บดแล้วของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ WSSV เช่นเดียวกัน พบว่าครัสตาเซียน 3 ชนิด เป็นพาหะของไวรัส WSSV เพราะสามารถมีชีวิตได้ช่วงระยะเวลาหนึ่งหลังจากได้รับเชื้อ จึงน่าจะมีศักยภาพในการแพร่เชื้อ WSSV สู่กุ้งได้

นอกจากนี้ กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (Supamattaya, et al.1998 : 1-7) ยังได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของสัตว์จำพวก crustacean ที่อาศัยตามบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง อันได้แก่ ปูม้า *Portunus pelagicus* ปูทะเล *Scylla serrata* และ เคย *Acetes* sp. รวมไปถึงศึกษาถึงผลกระทบของการรับเชื้อไวรัสดังกล่าวด้วย สำหรับการทดลองนั้น ได้นำสารสกัดจากเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากแหล่งธรรมชาติ โดยยืนยันผลการติดเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพื่อนำไปเป็นสารเหี่ยวนำในการทดลองสองประเภท คือ การฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองและนำไปผสมในน้ำที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง ส่วนเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสนำไปทดลองการรับเชื้อไวรัสจากการกิน ในการตรวจสอบผลจะใช้วิธี histology

,electron microscopy และ *in situ* hybridization ซึ่งปรากฏผลออกมาว่าสัตว์ทดลองทั้ง 3 ชนิดสามารถรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ในเคยนั้น การฉีดไวรัสส่งผลกระทบบมากที่สุดทำให้ตายได้ทั้งหมดในเวลา 3 วัน ส่วนการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อไวรัสส่งผลให้ตายทั้งหมดภายในเวลา 5 วัน และการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตายแค่เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนทั้งหมดใน 9 วัน สำหรับในปูนั้น การฉีดไวรัสส่งผลกระทบบมากที่สุดเช่นกัน ในปูม้าพบการตายทั้งหมดภายในเวลา 8 วัน แต่ในปูทะเลนั้นตายเพียงแค่ 20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนทั้งหมดในเวลา 9 วัน และการทดลองกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ พบว่า ไม่มีการตายของปูทั้ง 2 ชนิดในตลอดเวลา 9 วันที่ทดลอง ถึงแม้ว่าจะมีการยืนยันผลของการติดเชื้อแล้วด้วยวิธีทาง histology ดังนั้น จากผลการศึกษาจึงได้สรุปว่า ปูและเคยบางชนิดสามารถพิจารณาให้เป็นแหล่งของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เนื่องจากสามารถรับเชื้อไวรัสและยังดำรงชีวิตอยู่ได้ตามบริเวณฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง

ฮามีด, ชาร์ลส์ และอนิลกุมาร์ (Hameed , Charles & Anilkumar. 2000 : 207-213) ศึกษาการรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งน้ำจืด 3 ชนิด คือ *M. idella* *M. lamerrae* และ *M. rosenbergii* นำมาเปรียบเทียบกับในกุ้งน้ำเค็ม 2 ชนิด คือ *P. indicus* และ *P. monodon* โดยทดลองด้วยการจุ่มแช่ในน้ำที่เลี้ยงผสมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว การให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และ การฉีดสารสกัดจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จากนั้นบันทึกการตายสะสมของสัตว์ทดลอง พบการตายในกุ้ง *M. lamerrae* และ *M. idella* จากการแช่จุ่ม เป็น 43.3 เปอร์เซ็นต์ และ 53.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ จากการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส เป็น 53.3 เปอร์เซ็นต์ และ 66.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ การตายเป็น 100 เปอร์เซ็นต์จากการฉีดด้วยไวรัสในกุ้ง *M. idella* *M. lamerrae* *P. indicus* และ *P. monodon* โดยจากผลการตายนั้นนำตรวจด้วยวิธี Western blot และ histopathology พบว่าเป็นการตายที่เกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาว เว้นแต่ *M. rosenbergii* เท่านั้นที่ไม่มีอาการของโรคและการตายเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาที่ทดลอง 15 วัน

เชน และคณะ (Chen, et al. 2000 : 157-161) ใช้เทคนิค PCR และ *in situ* hybridization ในการตรวจการติดเชื้อ WSSV ในตัวอ่อนของปูทะเล *Scylla serrata* จากธรรมชาติและได้รับเชื้อ WSSV จากการทดลองโดยการจุ่ม ซึ่งจากการตรวจทางเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ WSSV ในตัวอ่อนของปูทะเลนี้เหมือนกับที่พบในกุ้ง

ยัยนั บ แวและ (2544 : บทคัดย่อ) ได้ศึกษาพาหะของไวรัสโรคหัวเหลือง โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae Panaedae และ Atydae โดยวิธี Immunohistochemistry จากการสำรวจ จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตน้กร่อย อำเภพระสมุทรเจดีย์ และเขตน้จืด อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ และนำมาตรวจหาการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ตามธรรมชาติ และทดลองให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง หรือด้วยการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน จากการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ไมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ๆ (135, 67 และ 22 กิโลดาลตัน) ของไวรัส

หัวเหลืองคือ V3-2B, Y18-2D และ Y19 ไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากกุ้งที่ได้จากธรรมชาติทั้ง 3 วงศ์ สำหรับกุ้งในวงศ์ Penaeidae คือ *Metapenaeus affinis* (4/10) เท่านั้น พบว่ามีการติดเชื้อหลังจากการให้เชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยการกิน ส่วนใหญ่มีการติดเชื้อรุนแรงเมื่อได้รับเชื้อโดยการฉีด ส่วนกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ทุกชนิด ไม่มีการติดเชื้อโดยการกิน แต่การให้เชื้อโดยการฉีด พบว่า *M. rosenbergii* (1/21) และ *M. lanchesteri* (4/22) เพียงส่วนน้อยที่แสดงการติดเชื้อ แต่ *M. sintangense* (8/12) และ *P. styliiferus* (9/10) ส่วนใหญ่จะมีการติดเชื้อแต่ไม่รุนแรง ผลการทดลองพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 135 กิโลดาลตันแสดงการติดสีปริมาณน้อย แตกต่างชัดเจนจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 67 และ 22 กิโลดาลตัน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับความสามารถในการทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ของกุ้งในกลุ่มนี้

รัชณี กลิ่นพุ่มซ้อน (2002 : บทคัดย่อ) ได้พัฒนาการตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ด้วยวิธี one - step nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT - PCR) สามารถตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ได้ถึงระดับ 0.01 พิโคกรัม และไพรเมอร์มีความจำเพาะกับไวรัสโรคหัวเหลือง โดยไม่มีผลผลิตจากต้นแบบจากนิวคลีอิกของไวรัสและแบคทีเรียชนิดอื่นรวมถึงกุ้งกุลาดำเองด้วย นอกจากนี้ทำการศึกษาการกระจายตัวของ ไวรัสโรคหัวเหลือง ในเหงือก ต่อมน้ำเหลือง ขาว่วยน้ำ ก้านชูตา และใน haemolymph จากกุ้งที่ติดเชื้อ ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง คือเลือดกุ้ง เนื่องจาก 6 ชั่วโมงหลังจากกุ้งติดเชื้อจะเกิดผลบวก 2 แถบ (200 คู่เบส และ 135 คู่เบส) เมื่อใช้ haemolymph เป็นตัวต้นแบบในการตรวจด้วยวิธี one - step nested RT - PCR ในขณะที่ตัวอย่างชนิดอื่นเกิดผลบวกเพียง 1 แถบ (135 คู่เบส) นอกจากนี้เลือดกุ้งยังเป็นตัวอย่างที่เก็บทำการทดลองได้สะดวกและไม่ทำให้กุ้งตายระหว่างการทดลอง จากนั้นทำการทดสอบการเป็นพาหะการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากปู 4 ชนิดคือ ปูม้า ปูทะเล ปูแสม และปูก้ามดาบ ไปสู่กุ้ง ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าปูเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองและสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำปกติได้โดยผ่านทางน้ำ

โคว์เลย์ และคณะ (Cowley, et al. 2002 : 95 -104) ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส chronic gill - associated virus (GAV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ระบาดในกุ้งกุลาดำที่จับจากธรรมชาติ และกุ้งกุลาดำเลี้ยง พบที่รัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค reverse transcription (RT) - nested PCR มาใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสจากถุงหุ้มอสุจิ จากเนื้อเยื่อรังไข่กุ้งที่เลี้ยงในฟาร์ม และรวมถึง ตรวจจากไข่ที่รับการผสมและตัวอ่อนที่เกิดจากแม่กุ้งจากในธรรมชาติ เมื่อทดลองเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบ กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* อายุมากกว่า 12 เดือน มีอัตราการตายสูง จึงได้นำกุ้งเพศผู้ไปตรวจสอบด้วย RT - nested PCR พบปริมาณไวรัส GAV ในส่วนของถุงอสุจิเป็นระดับที่มากกว่าในส่วนของอวัยวะน้ำเหลือง และจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบอนุภาคไวรัส GAV ในน้ำ

เลี้ยงอสุจิแต่ไม่พบที่ตัวเซลล์อสุจิ จากนั้นได้นำอวัยวะน้ำเหลือง ของกึ่งกลาดำน้ำหนัก 1.2 กรัม ที่ยังไม่โตเต็มที่จากฟาร์มแห่งหนึ่ง ทำการตรวจทาง histology พบเซลล์ hypertrophied cell foci หรือ spheroids รวมทั้งการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบ nucleocapsid และอนุภาคของเชื้อไวรัส GAV ในเซลล์ spheroid หลังจากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำการตรวจ PCR ในปอดและแม่กึ่งกลาดำและไข่ที่ผสมแล้ว พบว่าเชื้อไวรัส GAV ที่ติดต่อไปยังไข่นั้นมาจากทั้งปอดและแม่กึ่ง ถึงแม้ว่าจีโนมไทด์ GAV ในแม่กึ่งจะมีอิทธิพลต่อการถ่ายทอดไปยังไข่ แต่ความจริงนั้นขึ้นกับระดับความรุนแรงของการติดเชื้อในทั้งปอดและแม่กึ่งซึ่งทราบได้จากผลของ RT - PCR จากข้อมูล RT- nested PCR ที่ตรวจพบ ได้ระดับถึงระดับเชื้อไวรัส GAV ในไข่ และตัวอ่อนกึ่งในระยะต่าง ๆ ที่เกิดจากการจับคู่พ่อแม่กึ่งในห้องปฏิบัติการ ทำให้ทราบว่า การถ่ายทอดไวรัสจากพ่อแม่สู่รุ่นลูกนั้นสามารถติดต่อได้ทางผิวของไข่

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

กุ้งตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเป็นกุ้งชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Macrobrachium* ได้แก่ กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* กุ้งกะต๋อม1 *Macrobrachium sintangense* และกุ้งกะต๋อม2 *Macrobrachium equidens*

อุปกรณ์ และสารเคมี

1. อุปกรณ์สำหรับ immunohistochemistry
 - 1.1 เครื่องมือผ่าตัด
 - 1.2 ขวดรูปกรวยมีแขน (suction flask)
 - 1.3 เครื่องปั๊มดูดอากาศ (suction pump)
 - 1.4 สไลด์พร้อมกระจกปิดสไลด์
 - 1.5 โถแก้วสำหรับย้อมสไลด์ (couplin jar)
 - 1.6 ตะกร้าสำหรับย้อมสไลด์ (slide basket)
 - 1.7 แท่นอุ่นสไลด์ (slide warmer)
 - 1.8 ขวดแก้ว (vial)
 - 1.9 เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) LEICA RM 2135
 - 1.10 ไมโครปิเปต (micropipette) พร้อมทิป
 - 1.11 ตู้อบ (hot air oven)
 - 1.12 ตู้ดูดควัน (chemical fume hood)
 - 1.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 1.14. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (light microscope)
 - 1.15 กล้องและอุปกรณ์ในการบันทึกภาพ

2. อุปกรณ์สำหรับ RT-PCR

- 2.1 โกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อสำหรับบดเนื้อเยื่อตัวอย่าง
- 2.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 2.3 หลอด high pure spin filter
- 2.4 หลอด high pure collection
- 2.5 หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2.6 หลอด thin wall สำหรับ PCR
- 2.7 เครื่อง thermal cycler (Eppendorf)
- 2.8 เครื่อง ultraviolet transilluminator (Spectroline)
- 2.9 เครื่องเขย่าผสมสาร shaker (VRN – 360 KK)
- 2.10 เครื่อง electrophoresis apparatus และ เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power Pac

300 BIORAD)

- 2.11 เครื่องซังสาร
- 2.12 เครื่อง microwave oven (Turbora)
- 2.13 กล้อง polaroid (Gelcam) พร้อมฟิล์ม

3. สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

- 3.1 เอทิลแอลกอฮอล์ 70 % 80% 90% และ 95%
- 3.2 นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alclohol)
- 3.3 ไซลีน (xylene)
- 3.4 Davidson's fixative
- 3.5 พาราพลาสติก พลัส พาราฟิน (paraplast plus paraffin)
- 3.6 สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)
- 3.7 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffere saline, PBS) 0.15 โมลาร์

pH 7.2

- 3.8 สารละลาย P_1^+ (calf bovine serum : PBS dilution 1:10) วิธีเตรียมดู

ภาคผนวก

- 3.9 ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)

- 3.10 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30%
- 3.11 สี eosin 0.02 % ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 %

3.12 สี hematoxylin

3.13 แอนติบอดีสำหรับตรวจไวรัสโรคหั่วเหลือง

แอนติบอดีตัวแรก (first antibody) ที่ใช้คือโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัสหั่วเหลืองคือ V3-2B Y18-2D และ Y19 (Sithigorngul, et al. 2000 : 27-34)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B ซึ่งจำเพาะต่อ envelope protein ของไวรัส ขนาด 135 kDa

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D ซึ่งจำเพาะต่อ capsid protein ของไวรัส ขนาด 67 kDa และ

โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ซึ่งจำเพาะต่อ matrix protein ของไวรัส ขนาด 22 kDa

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

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างกุ้ง

เก็บตัวอย่างกุ้งชนิดต่าง ๆ จากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอมะนัง จังหวัดสมุทรสาคร อำเภอมะนัง จังหวัดสมุทรสาคร อำเภอมะนัง จังหวัดสมุทรสาคร และจังหวัดสุพรรณบุรี ได้แก่ กุ้งกระดอม กุ้งฝอย และกุ้งก้ามกราม ชนิดละประมาณ 120-200 ตัว นำมาเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ ที่ระดับความเค็มของน้ำ 5 – 10 ppt อุณหภูมิห้องและความยาวช่วงแสงธรรมชาติ

2. การพิสูจน์ทราบชนิด (Species identification)

นำกุ้งชนิดต่าง ๆ ชนิดละ 3-5 ตัว ดองด้วยสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เขียนรายละเอียดเกี่ยวกับสถานที่ วันที่เก็บ เพื่อเปรียบเทียบและจำแนกลักษณะ โดยใช้วิทยานิพนธ์เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดพังงา ของกัลยาณี ยงจินดารัตน์ (2531) วิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนิโคในประเทศไทย ของพิมลพรรณ สิละวัฒนากุล (2518) ในการพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้งสกุล *Macrobrachium*

3. การทดลอง

ทำการทดลอง 2 ขั้นตอน

3.1 ขั้นตอนที่ 1 เป็นการทดลองเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบการเป็นพาหะ โดยวิธี immunohistochemistry ในกุ้ง 2 ชนิดได้แก่ *Macrobrachium rosenbergii* และ *Macrobrachium lanchesteri*

3.1.1 การตรวจสอบการติดเชื้อตามธรรมชาติ สุ่มตัวอย่างกุ้ง ชนิดละประมาณ 10 ตัว เพื่อตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ตามธรรมชาติ

3.1.2 การตรวจสอบการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง นำตัวอย่างกุ้ง ชนิดละประมาณ 80-100 ตัว ฉีดเชื้อเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง แล้วเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ จากนั้นทำการตรวจสอบการติดเชื้อโดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 1 2 3 4 และ 5 ครั้งละอย่างน้อย 10 ตัว

3.2 ขั้นตอนที่ 2 การตรวจสอบการเป็นพาหะของกุ้งในสกุล *Macrobrachium*

3.2.1 เก็บตัวอย่างจากแหล่งเพาะเลี้ยงและซื้อตัวอย่างกุ้ง 4 ชนิด ได้แก่ *M. rosenbergii* *M. lanchesteri* *M. sintangense* และ *M. equidens*

3.2.2 การตรวจสอบการติดเชื้อทางธรรมชาติ สุ่มตัวอย่างกุ้ง ชนิดละประมาณ 20 ตัว เพื่อตรวจการติดเชื้อ YHV ตามธรรมชาติ

3.2.3 การตรวจสอบการติดเชื้อโดยการฉีด YHV นำตัวอย่างกุ้ง ชนิดละประมาณ 120-200 ตัว ฉีดเชื้อ YHV แล้วเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นทำการตรวจสอบการติดเชื้อโดยเก็บตัวอย่าง ในวันที่ 3, 10 และ 30 ครั้งละอย่างน้อย 20 ตัว

3.2.4 การทดลองศึกษาการติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งที่มีเชื้อ YHV โดยนำตัวอย่างกุ้งชนิดละประมาณ 120-200 ตัว มาเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 1 เดือนโดยให้กินเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อเป็นอาหารตลอดช่วงเวลาของการทดลอง จากนั้นทำการตรวจการติดเชื้อโดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 5, 10, 20 และ 30 ครั้งละอย่างน้อย 20 ตัว

3.2.5 นำตัวอย่างที่เก็บจากข้อ 3.2.2 ข้อ 3.2.3 และข้อ 3.2.4 มาตรวจสอบการติดเชื้อโดยนำตัวอย่างกุ้งที่เก็บมาทำให้สลายในน้ำเย็นจัดแล้วตัดอวัยวะส่วนหัวเป็นส่วนหนึ่งสำหรับการศึกษาโดยวิธี immunohistochemistry และอีกส่วนหนึ่งสำหรับการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR

4. การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology

4.1 นำตัวอย่างกุ้งที่เก็บได้จากแหล่งธรรมชาติ กุ้งที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และกุ้งที่กินเนื้อกุ้งติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง มาทำให้สลายในน้ำเย็นจัด ตัดส่วนหัวและผ่าตัดกึ่งกลางเป็น 2 ส่วน ตัดระยางค์ส่วนขาเดินออก

4.2 นำส่วนหัวที่ผ่าแล้วส่วนแรกไปทำให้คงรูป (fixed) ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หัวส่วนที่สอง แช่ใน lysis buffer เพื่อเตรียมทำ RT-PCR

4.3 นำหัวกุ้งมาล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อล้างน้ำยาทำให้คงรูป ออก

4.4 ตีงน้ำออก (dehydrate) จากหัวกุ้งด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ ต่าง ๆ และ นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ตามลำดับ จากนั้นอินฟิลเตรท (infiltrate) ด้วยพาราฟลาสต์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

4.4.1 นำหัวกุ้งมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.4.2 เปลี่ยนสารละลายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 90 % เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.4.3 เปลี่ยนสารละลายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % จำนวน 2 ครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.4.4 เปลี่ยนสารละลายเป็นนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4.5 เปลี่ยนสารละลายเป็นสารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ กับไซลีน ในอัตราส่วน 1 : 1 แช่หัวกุ้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.4.6 เปลี่ยนสารละลายเป็นไซลีน จำนวน 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในขณะที่อยู่ในสารละลายไซลีน นำหัวกุ้งไปกำจัดฟองอากาศ โดยใส่ใน desiccator แล้วไปกำจัดฟองอากาศด้วยเครื่องปั๊มดูดอากาศ

4.4.7 เปลี่ยนสารละลายเป็นไซลีนผสมกับพาราฟลาสต์ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1 : 1 เป็นเวลา 30 นาที

4.4.8 เปลี่ยนสารละลายเป็นพาราฟลาสต์ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจำนวน 3 ครั้งเป็นเวลาครั้งละ 45 นาที

4.5 นำหัวกุ้งที่อินฟิลเตรทด้วยพาราฟลาสต์แล้วไปฝัง (embed) ในพาราฟลาสต์ โดยเทพาราฟลาสต์ขณะที่หลอมเหลวลงไปในบล็อก (block) สีเหลืองจากนั้นใช้ปากคีบลงไฟ จับหัวกุ้งแต่ละหัวฝังในพาราฟลาสต์ โดยให้ด้านรอยผ่าของหัวกุ้งอยู่ทางด้านล่างของบล็อก

4.6 ตัดหัวกุ้งที่ฝังอยู่ในบล็อกด้วยเครื่องมือโครโตมแบบโรตารี (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนาขนาด 10 ไมครอนเรียงต่อกัน (serial section) เป็นริบบอน (ribbon) โดยตัดทางด้านล่างของบล็อกหรือตัดตามรอยผ่าของหัวกุ้ง

4.7 นำเซกชัน (section) ของหัวกุ้งมาติดบนสไลด์แก้ว เรียงตามลำดับเลือก เซกชันที่เห็นเนื้อเยื่อภายในตัดผ่านที่สมบูรณ์ โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย สารละลายเจลาติน (gelatin) ให้เป็นแถว ตามแนวนอนของสไลด์ จากนั้นนำแถวของเซกชัน ไปวางบนหยดน้ำ 1 แถวมี 3-4 เซกชัน 1 แถวต่อ 1 สไลด์ นำสไลด์วางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไม่ควรเกิน 50 องศาเซลเซียส เพราะจุดหลอมเหลวของ พาราฟินอยู่ที่ 58 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงจะทำให้เนื้อเยื่อกรอบ เมื่อเนื้อเยื่อแผ่ยืดยึดดี ไม่มีการซ้อนทับกันของเนื้อเยื่อแล้ว นำลงมาซับน้ำออกให้แห้งจนหมด เพื่อให้เนื้อเยื่อติดตรึง บนสไลด์ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ข้ามคืนก่อนนำมาใช้ หากซับน้ำออก ไม่แห้งให้อบในตู้อบจนน้ำออกหมดและแน่ใจว่าเนื้อเยื่อติดตรึงบนสไลด์ดีแล้วจึงค่อยนำมาใช้

5. กระบวนการย้อมโดยวิธีอินไดเรกติมูโนเปอร์ออกซิเดส

(indirect immunoperoxidase method)

กระบวนการย้อมโดยวิธีอินไดเรกติมูโนเปอร์ออกซิเดสโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี V3-2B โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และโมโน-โคลนอลแอนติบอดี Y19 โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.1 นำสไลด์ที่มีเซกชันมาละลายเอาพาราฟลาสต์ออก (deparaffination) โดย วางสไลด์ลงในตะกร้า (slide basket) แล้วจุ่มลงในโถแก้วย้อมสไลด์โดยแช่หัวกุ้งใน

5.1.1 โซลีนที่ 1 เป็นเวลา 10 นาที

5.1.2 โซลีนที่ 2 เป็นเวลา 5 นาที

5.1.3 โซลีนที่ 3 เป็นเวลา 5 นาที

5.2 เดิมน้ำ (hydration) เข้าสู่เนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

5.2.1 นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที

5.2.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 95 % เป็นเวลา 5 นาที

5.2.3 เอทิลแอลกอฮอล์ 90 % เป็นเวลา 5 นาที

5.2.4 เอทิลแอลกอฮอล์ 80 % เป็นเวลา 5 นาที

5.2.5 เอทิลแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 5 นาที

5.3 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย phosphate buffered saline (PBS) เพื่อ ล้างเอาแอลกอฮอล์ออกให้หมดโดย

5.3.1 จุ่มล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที

5.3.2 แช่เนื้อเยื่อในสารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 10 นาที

5.3.3 ล้างฟอร์มาลินออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

5.3.4 ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

5.4 ดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)

5.5 ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลาย P_1^+ หยดให้คลุมแต่ละเซกชัน เพื่อป้องกันการจับของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ บ่ม (incubate) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันเซกชันแห้ง นำไปเก็บไว้ในที่ชื้นโดยอาจเก็บในกล่องหรือจานเลี้ยงเชื้อ ปิดฝาภายในตู้ด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้น

5.6 การหยด first antibody บนเซกชันของเนื้อเยื่อ ดังภาพประกอบ 1 และ 2

5.6.1 ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละเซกชันออก ยกเว้นเซกชันที่เป็นตัวควบคุม

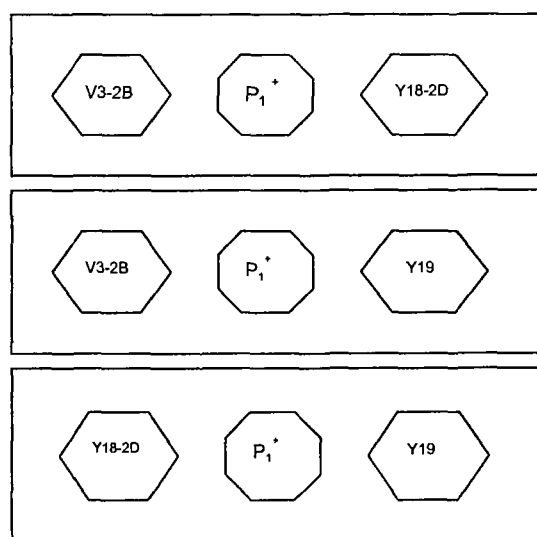
5.6.2 หยด first antibody ให้คลุมแต่ละเซกชัน First antibody ที่ใช้คือ

5.6.2.1 ไมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B

5.6.2.2 ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D

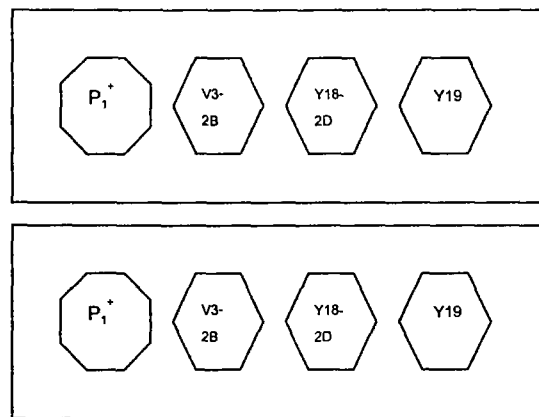
5.6.2.3 ไมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19

ไมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสามชนิดเจือจางในอัตราส่วน 1:5 ด้วย P_1^+



ภาพประกอบ 1 แสดงการหยด first antibody บนเซกชันในการตรวจหาเชื้อไวรัส

โรคหัวเหลืองในกุ่มทดลองที่ส่วนหัวมีขนาดใหญ่



ภาพประกอบ 2 แสดงการหยด first antibody บนเชกชั้นในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหัดเหลือง ในกึ่งตัวอย่างที่ส่วนหัวมีขนาดเล็ก

5.6.2.4 นำเนื้อเยื่อหัวกึ่งกูดำที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลืองโดยการฉีดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็น positive control โดยหยด first antibody ในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรคหัดเหลืองในแต่ละเชกชั้น เช่นเดียวกับภาพประกอบ 1 และ 2

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

5.7 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย PBS

5.7.1 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น อย่างรวดเร็วเพื่อล้างเอาแอนติบอดีออก

5.7.2 ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

5.8 การหยด secondary antibody บนเชกชั้นของเนื้อเยื่อ

5.8.1 ดูดสารละลาย PBS ในแต่ละเชกชั้นออก

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

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

5.9 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น ตามด้วย PBS

5.9.1 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น เพื่อล้างเอาแอนติบอดีออก

5.9.2 ล้างด้วย PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที

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

5.11 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5.12 ย้อมด้วยสี haematoxylin เป็นเวลา 5-10 นาที

5.12.1 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อล้างสีส่วนเกินออก

5.12.2 จุ่มเนื้อเยื่อในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้น 0.05%

อย่างรวดเร็ว

5.12.3 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที

5.12.4 จุ่มเนื้อเยื่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 %

อย่างรวดเร็ว

5.12.5 ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที (หากจะย้อมด้วยสี eosin อย่างเดียวได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย้อมสี hematoxylin)

5.13 ตี้น้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยจุ่มในสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

5.13.1 เอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที

5.13.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 80% เป็นเวลา 5 นาที

5.13.3 เอทิลแอลกอฮอล์ 90% เป็นเวลา 5 นาที

5.13.4 เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 5 นาที

5.14 ย้อมสี (counterstain) ของเนื้อเยื่อด้วย eosin 0.02% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95%

5.15 นำเนื้อเยื่อมาตี้น้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยผ่านสารละลายต่างๆ ดังนี้

5.15.1 นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 นาที

5.15.2 สารละลายผสมระหว่างนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอล์กับไซลีน (1:1) เป็นเวลา 5 นาที

5.15.3 ไซลีน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

5.16 ทำเป็นสไลด์ถาวรโดยฉีก (mount) ด้วยเปอร์แมท์ (permount) ทำโดยหยดเปอร์แมท์ประมาณ 3 หยด บนสไลด์และขอบด้านหนึ่งของกระจกปิดสไลด์บนเปอร์แมท์โดย

เอียงประมาณ 45 องศาแล้วค่อย ๆ วางลง ควรระวังมิให้ฟองอากาศเกิดขึ้น หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นให้นำสไลด์มาล้างเปอร์เม้าท์ออกด้วยไซลีนแล้วค่อยทำการผนึกสไลด์ใหม่อีกครั้ง

5.17 นำสไลด์ที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งของไวรัสโรคหัวเหลือง ในทุกเซกชันด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากการติดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในบริเวณต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อ

6. การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR

การทดลอง RT-PCR นี้ ทำการทดลองในกุ้งสกุล *Macrobrachium* 3 กลุ่มการทดลอง คือ กุ้งกลุ่มที่ตรวจสอบการติดเชื้อตามธรรมชาติ กุ้งกลุ่มฉีดด้วยเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และกุ้งที่กินเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

ขั้นตอนแรกจะต้องการสกัด RNA จากตัวอย่างทดลอง โดยใช้ชุดทดลอง high pure viral nucleic acid kit Cat no.1858874 ของบริษัท Roche Molecular Biochemicals

ขั้นตอน RT - PCR ใช้ primer ที่ออกแบบโดยชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์และคณะ (Wongteerasupaya, et al. 1997 : 81-186)

6.1 ขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง

6.1.1. นำส่วนหัวของตัวอย่างกุ้งแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่แบ่งมาจากการทดลองวิธี immunohistochemistry มาบดโดยผสมด้วยสารละลาย lysis buffer ประมาณ 40 มิลลิลิตร ในโถงที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำใส่หลอดปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 3000 x rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูด supernatant มาปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ผสมกับ working solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ proteinase K ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6.1.2 เติมน้ำ isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

6.1.3 นำหลอด high pure spin filter และ หลอด high pure collection ประกอบเข้าด้วยกัน จากนั้นเติมน้ำตัวอย่างทั้งหมดที่บ่มแล้วแยกลงในหลอดด้านบน ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

6.1.4 นำหลอด high pure collection ชุดใหม่กับหลอด high pure spin filter ประกอบเข้าด้วยกัน จากนั้นเติม inhibitor removal buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บนส่วนผสม นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

6.1.5 ล้างส่วนผสมในหลอด high pure spin filter โดยเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที กำจัดส่วนของเหลวในหลอด high pure collection แล้วทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง

6.1.6 นำหลอด high pure spin filter ที่ได้จากการล้าง 2 ครั้งด้วยสารละลาย wash buffer ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที แล้วจึงกำจัดส่วนของเหลวของหลอด high pure collection

6.1.7 นำหลอด high pure spin filter กับหลอด microcentrifuge ประกอบเข้าด้วยกัน จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

6.1.8 เก็บกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ ทำการทดลองตัวควบคุมไปพร้อมกันโดยนำ haemolymph ของกิ้งกูดดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองทำในทุกขั้นตอนในการทำ RT – PCR ส่วนในตัวควบคุมผลบ่งใช้น้ำกลั่น

6.2 เทคนิค RT – PCR มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

6.2.1 ผสมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT – PCR รวมทั้งตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อแต่ละหลอดของหลอด thin wall ที่มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้

RT - PCR buffer	25	ไมโครลิตร
Primer 10F	1	ไมโครลิตร
Primer 144R	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ RT/Taq Polymerase	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	17	ไมโครลิตร
RNA Template (ตัวอย่าง)	5	ไมโครลิตร

6.2.2 นำหลอดใส่เครื่อง thermal cycler ปรับตั้งอุณหภูมิและเวลาในการทำงานของเครื่อง ได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 42 °C เวลา 15 นาที

ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 95 °C เวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 4 °C เวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 4 อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที

อุณหภูมิ 58 °C เวลา 30 วินาที

อุณหภูมิ 72 °C เวลา 30 วินาที

หมายเหตุ ขั้นตอนที่ 4 นี้ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 5 อุณหภูมิ 72 °C เวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่ 6 อุณหภูมิคงที่ ที่ 4 °C

การทำงานของ thermal cycler ในแต่ละขั้นตอนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง คือ ขั้นตอนที่ 1– 3 ขั้นตอนละ 1 รอบจะมีผลทำให้ RNA เปลี่ยนไปเป็น c DNA (complementary DNA)

ขั้นตอนที่ 4

- เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา
- อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส DNA ถูกทำให้แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว 2 สาย (denaturation) อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ primer ทั้ง 2 สามารถเข้าจับที่ตำแหน่งเฉพาะของ DNA สายเดี่ยวทั้ง 2 สาย (annealing)
- อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ Taq polymerase ทำงานโดยเร่งปฏิกิริยาการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 ' ของ primer ทำให้ DNA เป็นสายยาว เกิดการจำลองที่สมบูรณ์ (elongation)

ขั้นตอนที่ 5 – 6 สิ้นสุดปฏิกิริยา และเก็บ DNA ที่อุณหภูมิ 4 °C

6.3 แสดงผลโดยวิธี gel agarose electrophoresis

6.3.1 เตรียมเจลที่จะใช้แสดงผลโดย ชั่งผง agarose gel ปริมาณ 0.75 กรัม ละลายด้วย TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องไมโครเวฟปรับความร้อนปานกลาง นานประมาณ 2 นาที จนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงไปใน block พร้อมเสียบแผ่นหวีพลาสติก (comb) ให้เจลเกิดเป็นร่องได้ทั้งหมด 8 ร่อง ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

6.3.2 นำสี Loading dye (Blue/Orange 6x Loading dye) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เติมในหลอด microcentrifuge เตรียมไว้ให้ครบจำนวนตัวอย่างที่จะหยอดแสดงผลในเจล

6.3.3 ใส่ตัวอย่างที่ได้หลังจากการทำ RT – PCR ซึ่งได้แก่ ตัวอย่างกึ่งแต่ละชนิด ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก และตัวควบคุมผลลบ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด Blue/Orange 6x Loading dye ที่เตรียมไว้

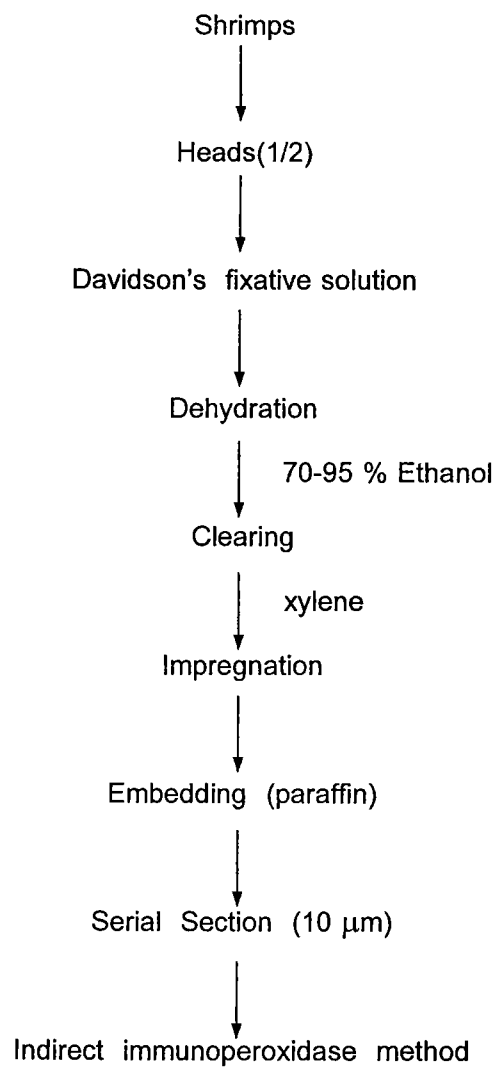
6.3.4 นำเจลที่แข็งตัวแล้ววางลงในเครื่องแสดงผลที่มีสารละลาย TBE buffer รองรับอยู่ในปริมาตรที่พอประมาณท่วมเจล เติมสารต่าง ๆ ลงในไปร่องเจลโดยจากนั้นดูดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งได้แก่ DNA marker ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก ตัวควบคุมที่ให้ผลลบ และตัวอย่างกึ่งแต่ละชนิด

6.3.5 เมื่อเติมสารทุกอย่างครบแล้ว เปิดเครื่องให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง ให้เกิดแถบที่สังเกตได้จากสีที่ย้อมในแต่ละร่องเจลอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมคือเกือบจะถึงด้านล่างของเจล จากนั้นจึงปิดเครื่องให้กระแสไฟฟ้า

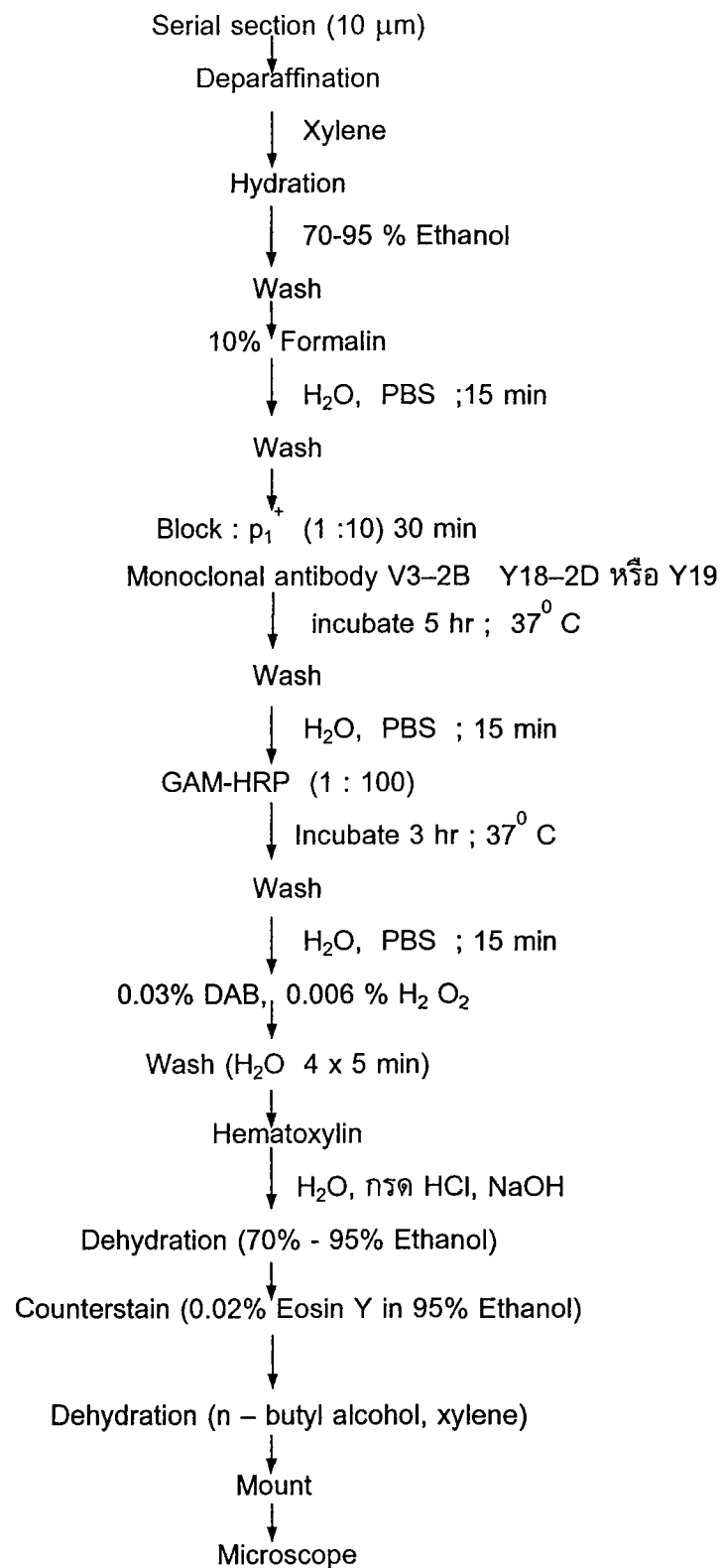
6.3.6 นำเจลไปย้อมด้วยสี ethidium bromide เป็นเวลา 10 – 20 นาที และล้างสีออกโดยแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวางบนเครื่อง ultraviolet transilluminator เพื่อดูผลที่ได้ผ่านแสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายรูปด้วยกล้อง polaroid

การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างกึ่งที่เก็บ และซื้อมาจากแหล่งต่าง ๆ และพิสูจน์ทราบชนิดกึ่งตัวอย่างเพื่อแยกกลุ่มทดลอง
2. ตรวจสอบและเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัสโรคหัดเหลือง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี V3-2B โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y18-2D และโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ในเนื้อเยื่อบริเวณหัวกึ่ง
3. ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัดเหลืองของอวัยวะต่าง ๆ ในบริเวณเนื้อเยื่อหัวกึ่งทดลองชนิดต่าง ๆ
4. ถ่ายภาพแสดงตำแหน่งที่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัดเหลือง
5. ตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธี RT-PCR และบันทึกภาพ
6. นำเสนอข้อมูลด้วยภาพและตาราง

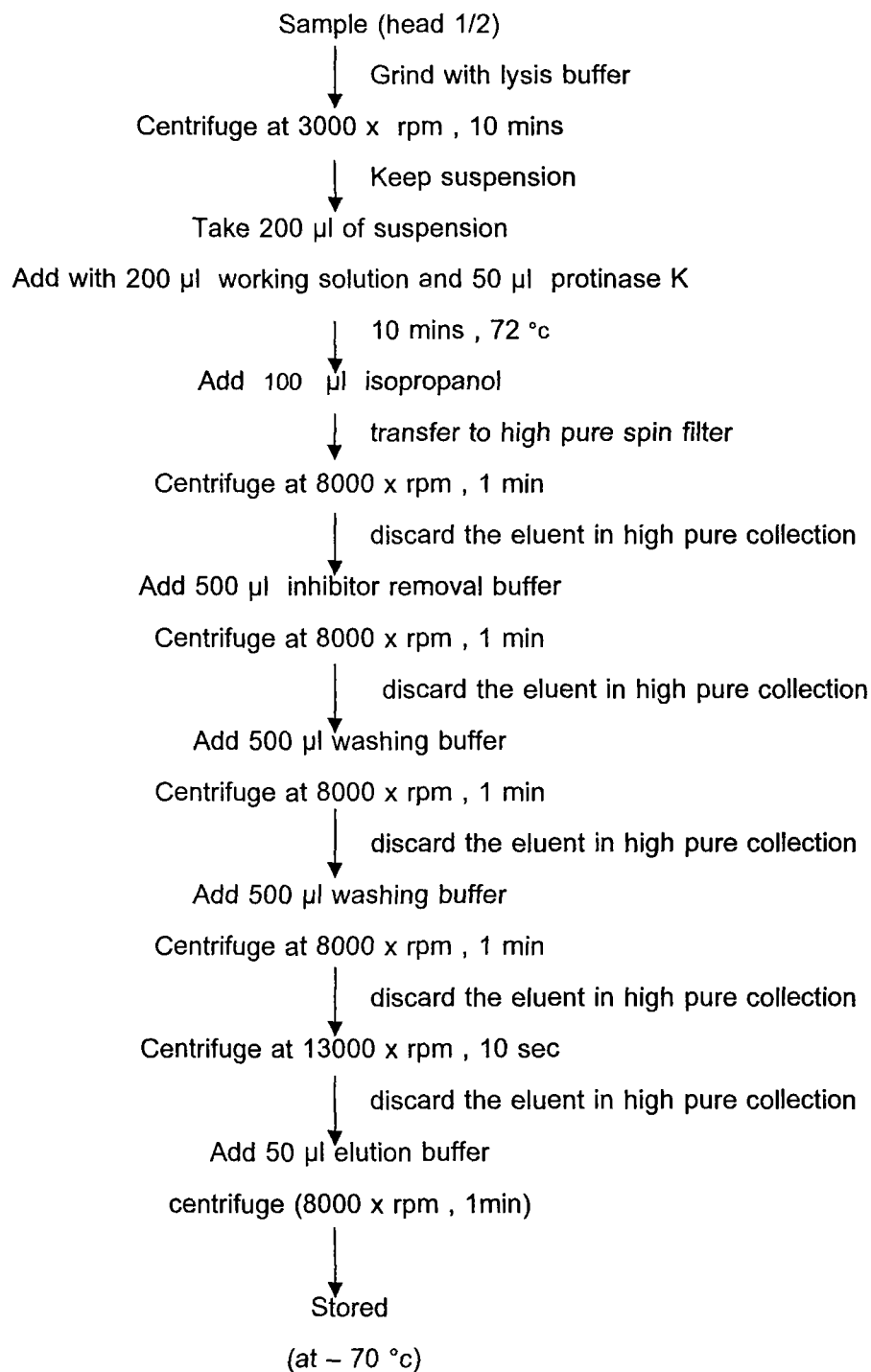


ภาพประกอบ 3 การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology (Sithigorngul, et al. 2000 : 27-34)

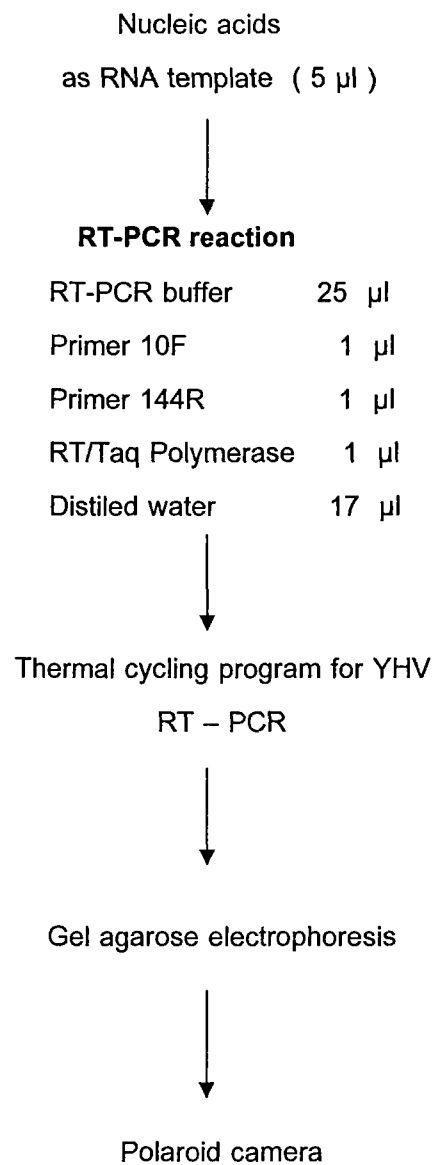


ภาพประกอบ 4 ขั้นตอนการตรวจเชื้อไวรัสโรคหัดเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งโดยวิธี

indirect immunoperoxidase (Sithigorngul, et al. 2000 : 27-34)



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการสกัด RNA จากตัวอย่าง



ภาพประกอบ 6 ขั้นตอน RT-PCR (Wongteerasupaya, et al. 1997: 81-186)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การพิสูจน์ทราบชนิดของกุ้งสกุล *Macrobrachium* เพื่อแยกกลุ่มการทดลอง

จากการเก็บรวบรวมและซื้อกุ้งตัวอย่างจากบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในอำเภอสระบุรี จังหวัดสมุทรปราการ อำเภอนครศรีอยุธยา จังหวัดนครศรีอยุธยา และจังหวัดสุพรรณบุรี นำตัวอย่างกุ้งมาตรวจดูลักษณะต่าง ๆ เปรียบเทียบตาม วิทยานิพนธ์เรื่องการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืด ในจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงาของกัลยาณี ยงจินดารัตน์ (2531) และวิทยานิพนธ์เรื่องอนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนีคในประเทศไทยของพิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล (2518)

การพิสูจน์ทราบชนิดกลุ่มตัวอย่างพบกุ้ง ที่อยู่ในสกุล *Macrobrachium* ชนิดต่าง ๆ ได้ดังนี้

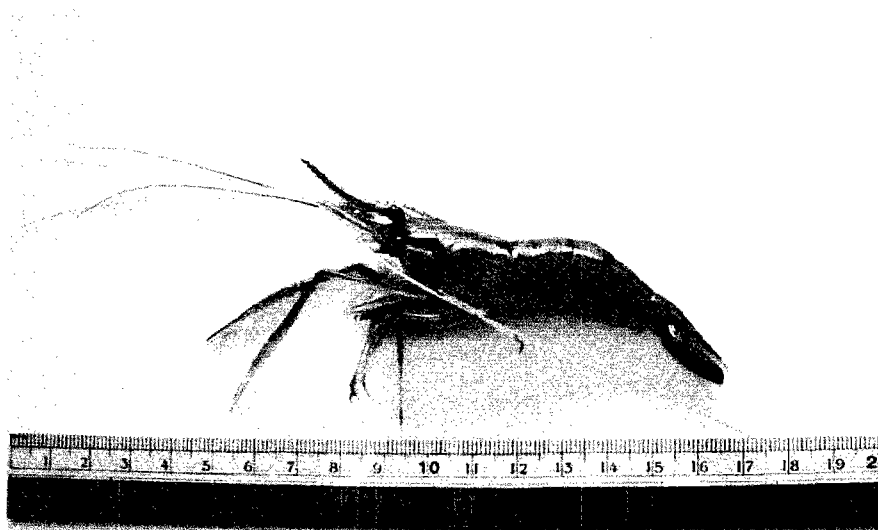
1.1 กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบได้ทั่วไปในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในอำเภอสระบุรี จังหวัดสมุทรปราการ และจากแหล่งเลี้ยงในน้ำจืด อำเภอนครศรีอยุธยา จังหวัดนครศรีอยุธยา ลักษณะของกุ้งก้ามกราม กุ้งส่วนโคนที่อยู่เหนือตาโค้งนูนขึ้นและส่วนปลายเรียวงอนขึ้น ขาเดินคู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่และยาวไม่เท่ากัน ผิวด้านนอกของขาเดินมีหนามแหลมเรียงอยู่กระจัดกระจาย นิ้วของก้ามหนีบเคลื่อนไหวได้ มีขนปุกปุยคลุมอย่างหนาแน่น (ภาพประกอบ 7)

1.2 กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* พบได้ทั่วไปในบ่อเลี้ยงกุลาดำในอำเภอสระบุรี จังหวัดสมุทรปราการ และในแหล่งน้ำจืดจังหวัดนครศรีอยุธยา และจังหวัดสุพรรณบุรี ลักษณะของกุ้งฝอย กุ้งมีลักษณะตรงและยาวพอดีกับปลายของแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรูปทรงกระบอกยาวเรียวและมีส่วนของก้ามหนีบยาวเลยปลายของกรรไกรตัวใสไม่มีสี (ภาพประกอบ 8)

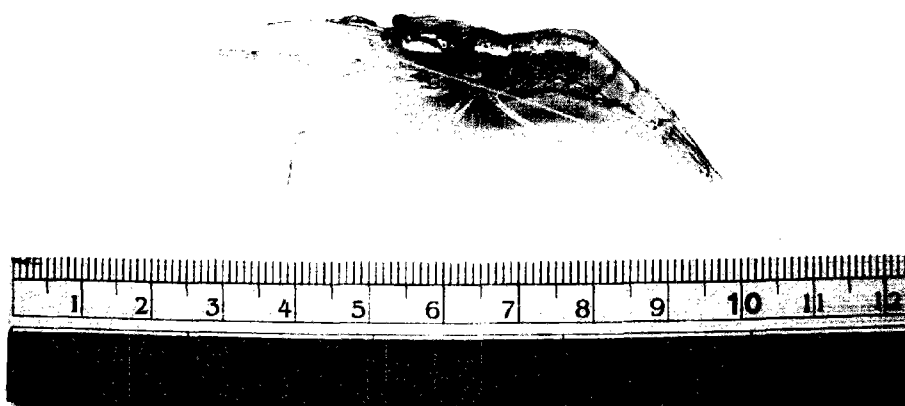
1.3 กุ้งกะต๋อม *Macrobrachium sintangense* พบมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอสระบุรี จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งกะต๋อม1 กุ้งมีลักษณะเรียวงอน

ลำตัวเป็นสีน้ำตาลหรือฟ้าแกมเขียว ขาเดินคู่ที่ 2 มีปื้นสีน้ำตาลกระจายอยู่เป็นหย่อมรอยต่อระหว่างของขาเดินคู่ที่ 3 คู่ที่ 4 และคู่ที่ 5 มีสีส้มแกมแดง (ภาพประกอบ 9)

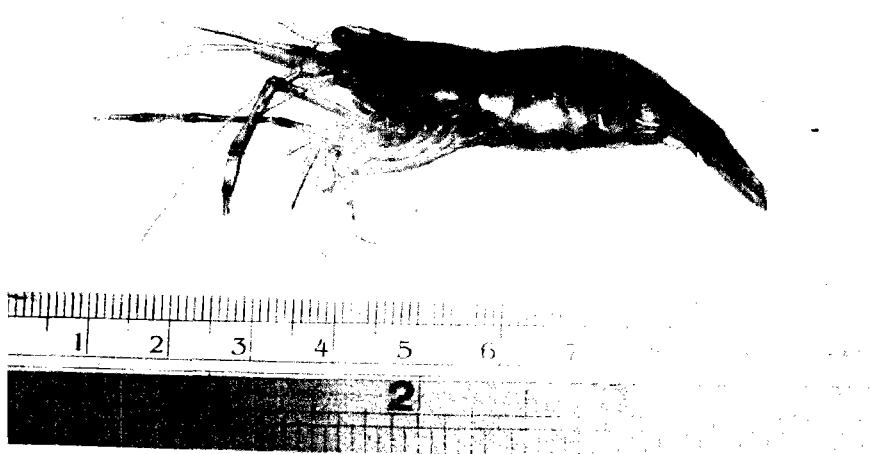
1.4 กุ้งต่อม 2 *Macrobrachium equidens* พบมากในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ ลักษณะของกุ้งชนิดนี้ กุ้งมีลักษณะเรียวยาวตรงงอนขึ้นเล็กน้อยตอนปลายและยาวเลยแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 สีของลำตัว ตัวผู้มีสีเขียว ตัวเมียมีสีเทาหรือฟ้าแกมเขียว บริเวณขอบปลายของส่วนท้องปล้องที่ 3 มีแถบใสไม่มีสีคาดตามขวาง ขาเดินคู่ที่ 2 ของตัวผู้ยาวกว่าความยาวของลำตัว ขาเดินคู่ที่ 2 ของตัวเมียจะสั้นกว่าความยาวของลำตัว (ภาพประกอบ 10)



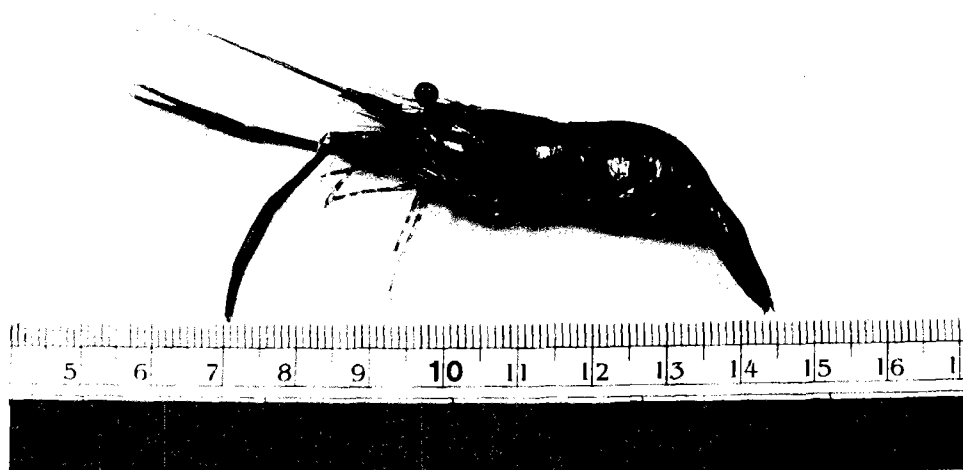
ภาพประกอบ 7 ลักษณะของกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของกุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri*



ภาพประกอบ 9 ลักษณะของกุ้งกะต๋อม1 *Macrobrachium sintangense*



ภาพประกอบ 10 ลักษณะของกุ้งกะต๋อม2 *Macrobrachium equidens*

2. การทดลองเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบการเป็นพาหะ

การทดลองเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium* โดยใช้วิธี Immunohistochemistry ได้ทำการทดลองในกุ้ง 2 ชนิด ได้แก่ กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และกุ้งฝอย *M. lanchesteri* ทำการทดลองตรวจสอบการติดเชื้อ ดังนี้

2.1 ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองตามธรรมชาติโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งชนิดละ 10 ตัว

2.2 ตรวจสอบการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 1 2 3 4 และ 5 วัน แล้วทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งทั้ง 2 ชนิดครั้งละ 10 ตัว

ผลการตรวจสอบไม่พบการติดเชื้อในทุก ๆ อวัยวะของกุ้งทั้งสองชนิดทั้งการตรวจสอบการติดเชื้อตามธรรมชาติ และภายหลังจากการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 1 2 3 4 และ 5 วัน ดังตาราง 2

ตาราง 2 การตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry ในกุ้ง
 ก้ามกราม *M. rosenbergii* และ กุ้งฝอย *M. lanchesteri* ที่ได้จากธรรมชาติ (0 วัน)
 และหลังจากฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 5 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกวัน
 (ตัวเลขแสดงจำนวนกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง/ จำนวนตัวอย่างที่สุ่มเก็บ)

เวลา (วัน)	จำนวนกุ้งที่ติดเชื้อ	
	กุ้งก้ามกราม <i>M. rosenbergii</i>	กุ้งฝอย <i>M. lanchesteri</i>
0	0/10	0/10
1	0/10	0/10
2	0/10	0/10
3	0/10	0/10
4	0/10	0/10
5	0/10	0/10

3. การทดลองเพื่อตรวจสอบการเป็นพาหะไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้ง

สกุล *Macrobrachium*

ได้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างกุ้งสกุล *Macrobrachium* ชนิดต่าง ๆ จากบริเวณ
 แหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้แก่ กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* กุ้งฝอย *M. lanchesteri* กุ้งกะ-
 ต่อม1 *M. sintangense* และกุ้งกะต่อม2 *M. equidens* จากนั้นนำตัวอย่างกุ้งชนิดละ 15-20
 ตัว มาตัดแบ่งส่วนหัวออกเป็น 2 ส่วน โดยนำส่วนหนึ่งมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัว
 เหลืองโดยวิธี immunohistochemistry และอีกส่วนหนึ่งสำหรับตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธี
 RT-PCR

3.1 การตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งจากธรรมชาติโดยวิธี

immunohistochemistry

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากกุ้งสกุล *Macrobrachium* ที่เก็บรวบรวมได้ 4 ชนิด ได้แก่ กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* กุ้งฝอย *M. lanchesteri* กุ้งกะต๋อม1 *M. sintangense* และ กุ้งกะต๋อม2 *M. equidens* โดยเก็บตัวอย่างกุ้งชนิดละ 15 - 20 ตัว แบ่งส่วนหัว 1/2 ส่วนมาตรวจสอบโดยวิธี immunohistochemistry ได้ผลดังนี้ (ตาราง 3)

3.1.1 กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* นำส่วนหัวกุ้งก้ามกรามจำนวน 15 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในทุกเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามทุกตัว

3.1.2 กุ้งฝอย *M. lanchesteri* นำส่วนหัวกุ้งฝอยจำนวน 20 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณต่าง ๆ ไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในทุกเนื้อเยื่อของกุ้งฝอยทุกตัว

3.1.3 กุ้งกะต๋อม1 *M. sintangense* นำส่วนหัวกุ้งกะต๋อมจำนวน 20 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณต่าง ๆ ไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองทุกเนื้อเยื่อของกุ้งกะต๋อม1ทุกตัว

3.1.4 กุ้งกะต๋อม2 *M. equidens* นำส่วนหัวกุ้งจำนวน 15 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งที่บริเวณต่าง ๆ ไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองทุกเนื้อเยื่อของกุ้งกะต๋อม2 *M. equidens* ทุกตัว

3.2 การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry

จากการนำกลุ่มกุ้งตัวอย่างที่รวบรวมได้ชนิดละ 80 -100 ตัวมาฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง แล้วเลี้ยงในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 30 วัน ระหว่างการเลี้ยงได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองนำมาตรวจสอบการติดเชื้อ ในวันที่ 0 3 10 และ 30 วัน ได้ผลดังนี้ (ตาราง 3)

3.2.1 กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* นำส่วนหัวกุ้งก้ามกรามจำนวน 15 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อของกุ้งก้ามกรามทุกตัว ในทุก ๆ ช่วงเวลาของการทดลอง

3.2.2 กุ้งฝอย *M. lanchesteri* นำส่วนหัวกุ้งฝอยจำนวน 10-20 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อพบว่ากุ้งฝอยมีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 1/ 10 ตัว หลัง

การฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 3 วัน ส่วนที่เวลา 10 และ 30 วัน หลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ไม่พบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อใด ๆ

3.2.3 กุ้งกะต้อม1 *M. sintangense* นำส่วนหัวกุ้งกระต้อมจำนวน 15-25 ตัว มาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองพบว่าหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 3 วันและ 10 วันกุ้งกะต้อมมีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 25/25 และ 20/20 ตัวตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลา 30 วันหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง พบว่ามีการติดเชื้อ 6/17 ตัว

3.2.4 กุ้งกะต้อม2 *M. equidens* นำส่วนหัวกุ้งมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 3 วัน และ 10 วัน พบว่ากุ้งมีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 7/13 และ 1/12 ตัวตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลา 30 วัน หลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากตัวอย่างมีจำนวนน้อย

ตาราง 3 การตรวจสอบการเป็นพาหะไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งสกุล *Macrobrachium* จากธรรมชาติ (0 วัน) และหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 30 วัน ภายหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมาตรวจการติดเชื้อในวันที่ 3 10 และ 30 (ตัวเลขแสดงจำนวนกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง/ จำนวนตัวอย่างที่สุ่มเก็บ)

ระยะเวลา (วัน) หลังการฉีดเชื้อ ไวรัสโรคหัว เหลือง	จำนวนกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง			
	กุ้งก้ามกราม	กุ้งฝอย	กุ้งกะต้อม1	กุ้งกะต้อม2
	<i>M. rosenbergii</i>	<i>M. lanchesteri</i>	<i>M. sintangense</i>	<i>M. equidens</i>
0	0/15	0/10, 0/20	0/15	0/15
3	0/15	1/10, 3/20	25/25	7/13
10	0/15	0/17, 0/20	20/20	1/12
30	0/15	0/15, 0/20	6/17	-

3.3 การทดลองเพื่อตรวจสอบการเป็นพาหะไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งสกุล *Macrobrachium* โดยการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (ตาราง 4)

3.3.1 กุ้งฝอย *M. lanchesteri* นำส่วนหัวกุ้งฝอยจำนวน 20 ตัว มาตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อพบว่ากุ้งฝอย มีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองหลังการกินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในวันที่ 20 และ 30 จำนวน 4/20 และ 2/20 ตัว ตามลำดับ

3.3.2 กุ้งกระต้อม1 *M. sintangense* นำส่วนหัวกุ้งกระต้อมจำนวน 20 ตัว มาตรวจสอบการติดเชื้อพบว่าหลังการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง กุ้งกระต้อมมีการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในวันที่ 10 20 และ 30 จำนวน 4/20 1/20 และ 2/20 ตัว ตามลำดับ

3.3.3 กุ้งกระต้อม2 *M. equidense* นำส่วนหัวกุ้งตัวอย่างมาตรวจการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อต่างๆ พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อหลังการกินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง วันที่ 5 จำนวน 1/17 ตัว

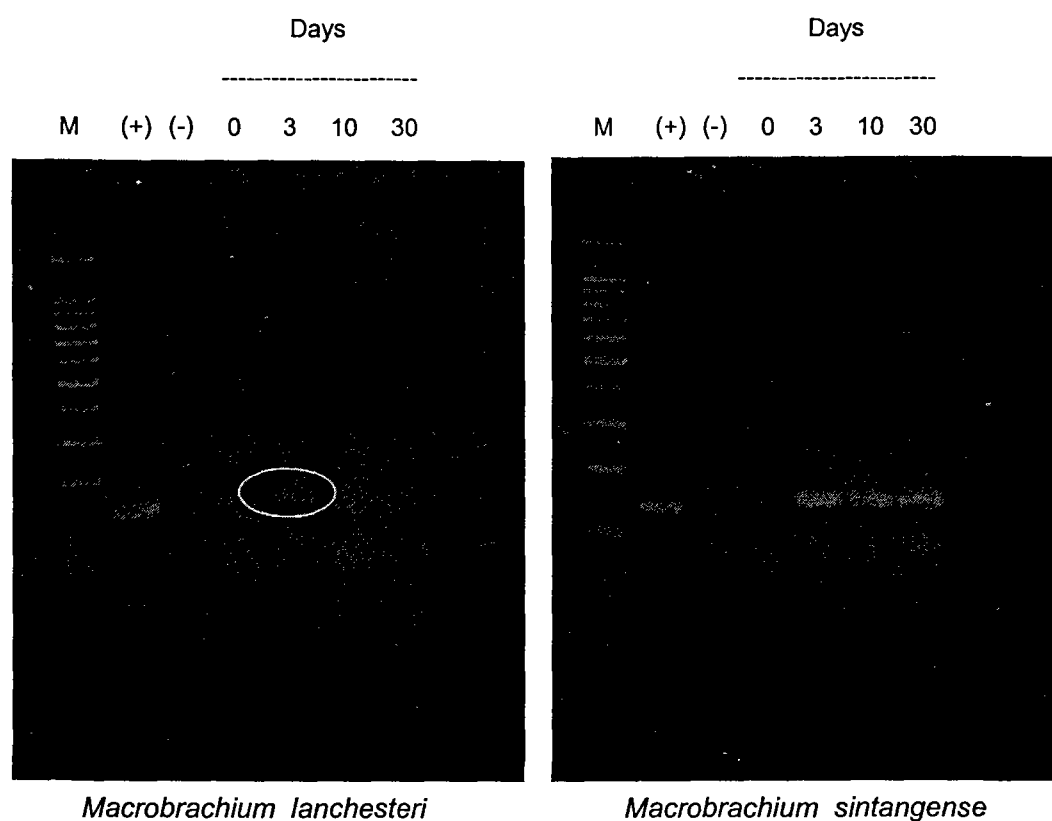
ตาราง 4 การตรวจสอบการเป็นพาหะไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งสกุล *Macrobrachium* จากธรรมชาติ (0 วัน) และหลังการทำให้ติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบการติดเชื้อในวันที่ 3 10 และ 30

(ตัวเลขแสดงจำนวนกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง/ จำนวนตัวอย่างที่สุ่มเก็บ)

ระยะเวลา (วัน)	จำนวนกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง		
	กุ้งฝอย	กุ้งกระต้อม1	กุ้งกระต้อม2
	<i>M. lanchesteri</i>	<i>M. sintangense</i>	<i>M. equidens</i>
0	0/20	0/20	0/15
5	0/20	0/20	1/17
10	0/20	4/20	0/15
20	4/20	1/20	-
30	2/20	2/20	-

3.4 การตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR

การตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR โดยการแบ่งเนื้อเยื่ออวัยวะส่วนหัวกุ้งทดลอง 1/2 ส่วนที่แบ่งเก็บไว้ใน lysis buffer มาทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ผลการตรวจไม่พบการติดเชื้อในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* ในทุกช่วงเวลาของการทดลอง กุ้งกระต้อม *M. sintangense* พบการติดเชื้อหลังการฉีดเชื้อในวันที่ 3 10 และ 30 วันตามลำดับ ส่วนกุ้งฝอย *M. lanchesteri* พบว่ามีการติดเชื้อในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (ภาพประกอบ 11)



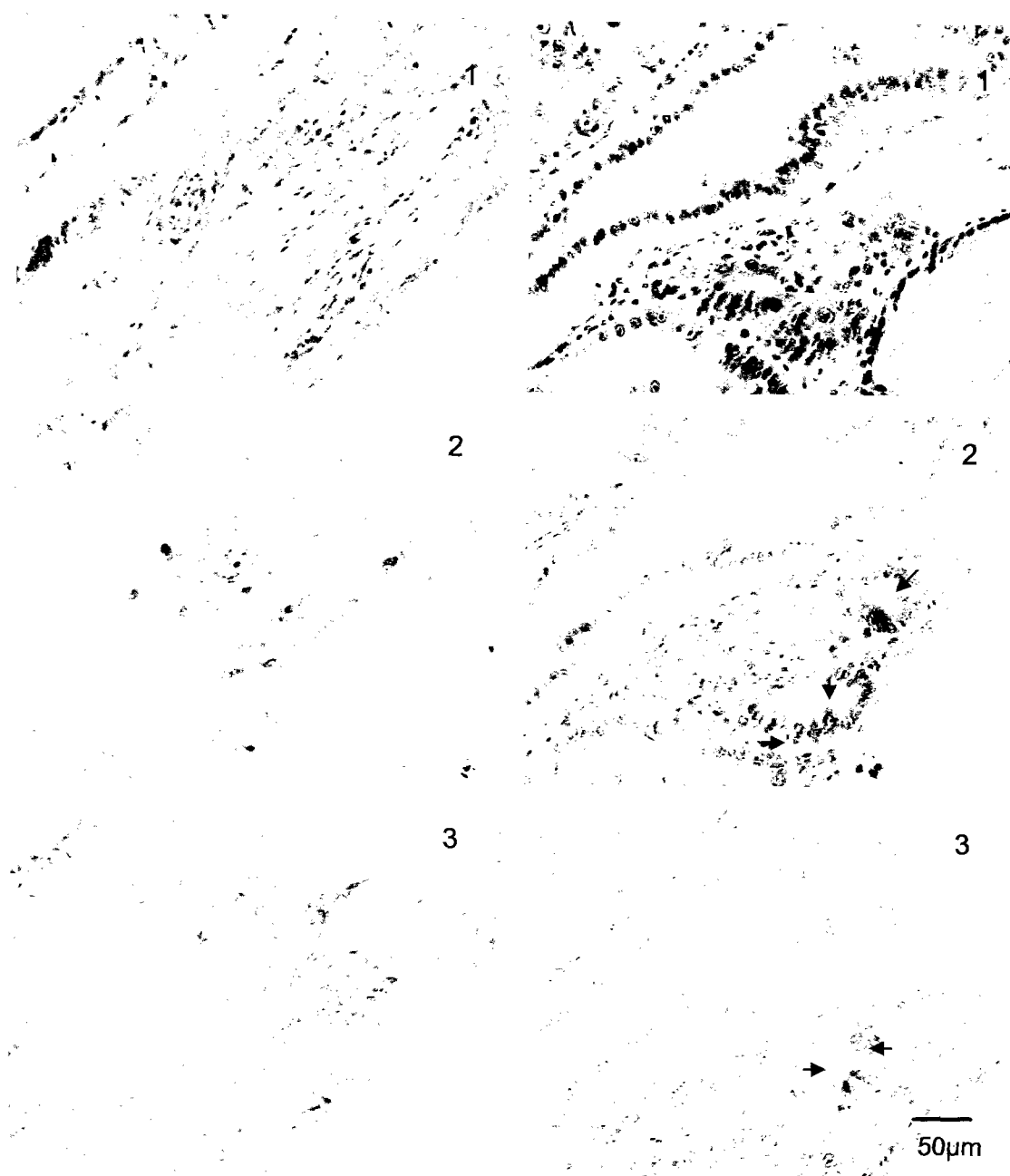
ภาพประกอบ 11 RT-PCR ของกุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* (ซ้าย) และ

กุ้งกระต้อม *Macrobrachium sintangense* (ขวา)

M = DNA marker (+) = ตัวอย่างควบคุมผลบวก

(-) = ตัวอย่างควบคุมผลลบ 0 = ตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติ

3 10 และ 30 คือ เวลา (วัน) หลังการฉีดเชื้อ



ภาพประกอบ 12 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเนื้อเยื่อบริเวณ nerve cord (ซ้าย) และ hepatopancreas (ขวา) ของกุ้งฝอย *M. lanchesteri* ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน โดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 13 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (ซ้าย และขวา) ของกิ้งฟอย *M. lancesteri* ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันโดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 14 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณ

hepatopancreas (ซ้าย) และ connective tissue (ขวา) ของกุ้งกะต้อม1

M. sintangense ที่ฉีดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันโดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)

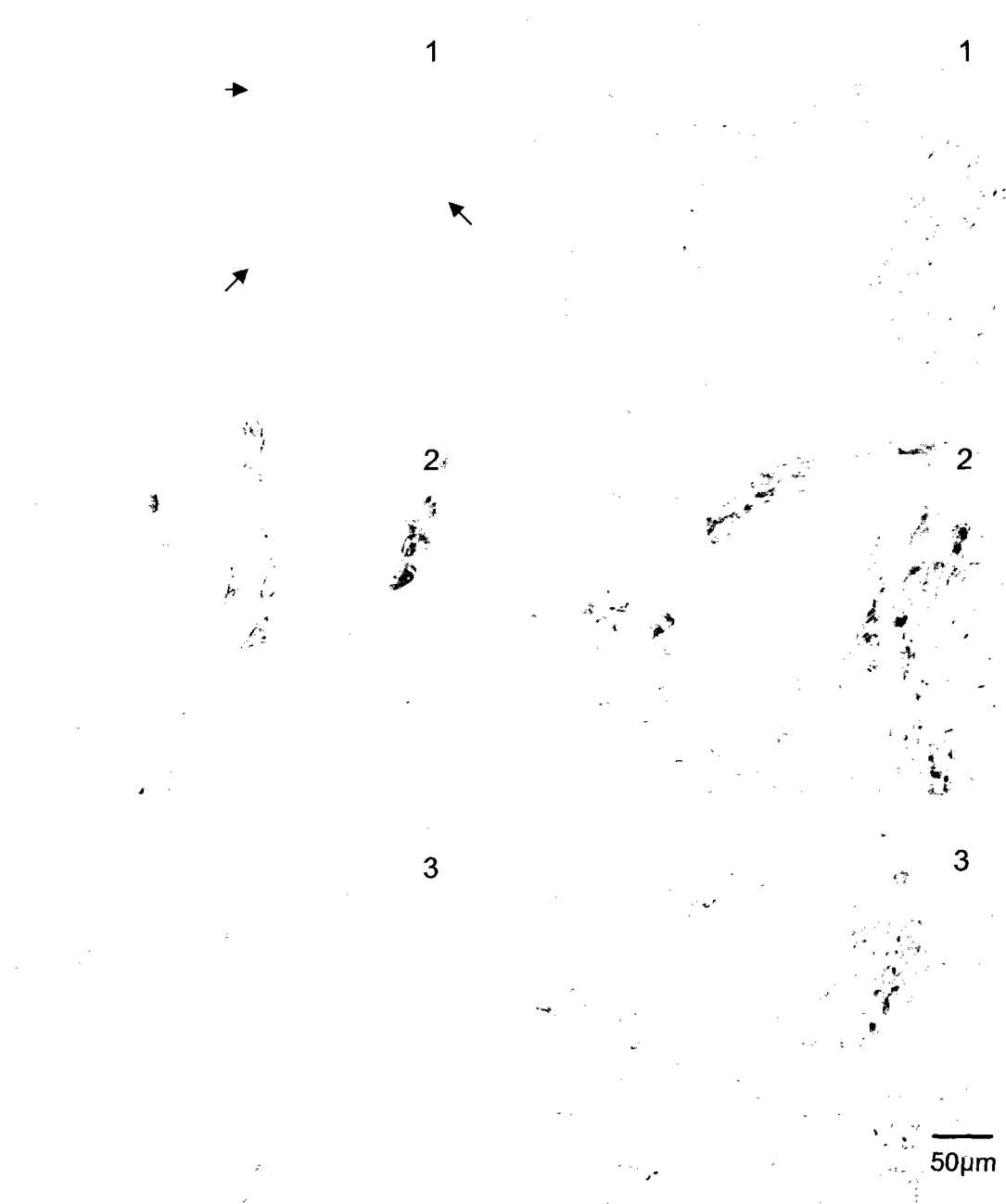
2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 15 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณ hepatopancreas (ซ้าย) และ หัวใจ (ขวา) ของกุ้งกะต้อม *M. sintangense* ที่ฉีดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันโดยใช้

- 1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)
- 2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)
- 3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 16 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณเนื้อเยื่อ connective tissue (ซ้าย) และ ovary (ขวา) ของกิ้งก่าต่อม *M. sintangense* ที่ฉีดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันโดยใช้

- 1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)
- 2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)
- 3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 17 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณ

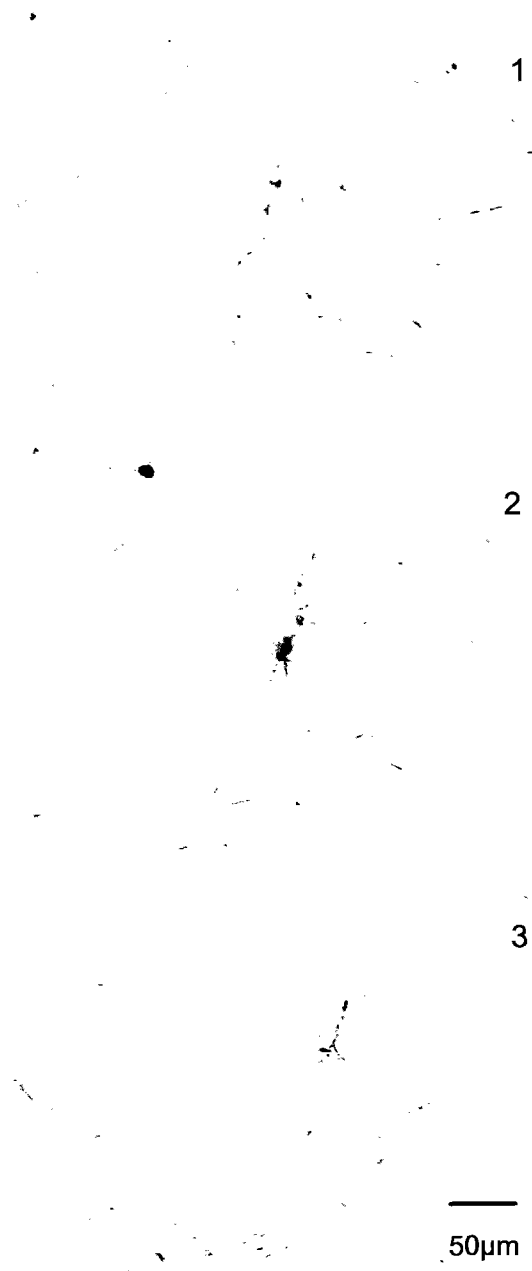
connective tissue (ข้าย) และเนื้อเยื่อผิวหนังใต้เปลือก (ขวา) ของกิ้งก่าต่อม 1

M. sintangense ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันโดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 18 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณกล้ามเนื้อของกิ้งก่าต่อม *M. sintangense* ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เป็นเวลา 10 วันโดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

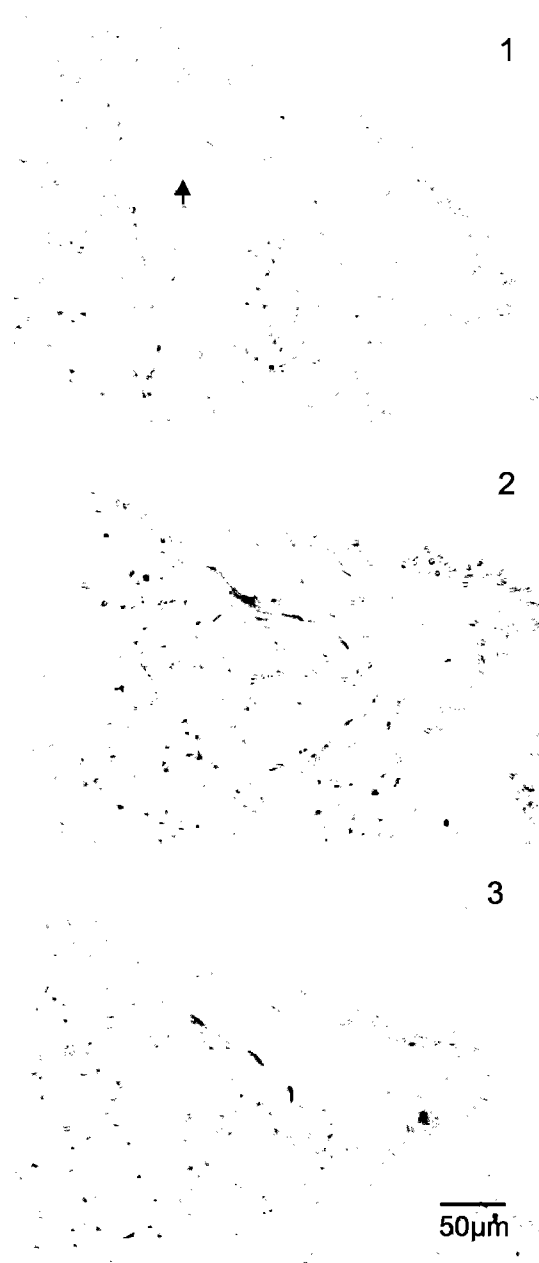
3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 19 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวใจเหลืองบริเวณหัวใจ (ซ้าย) และเนื้อเยื่อบุผิวไตเปลือก (ขวา) ของกึ่งกะต้อม 1 *M. sintangense* ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวใจเหลืองเป็นเวลา 10 วันโดยใช้

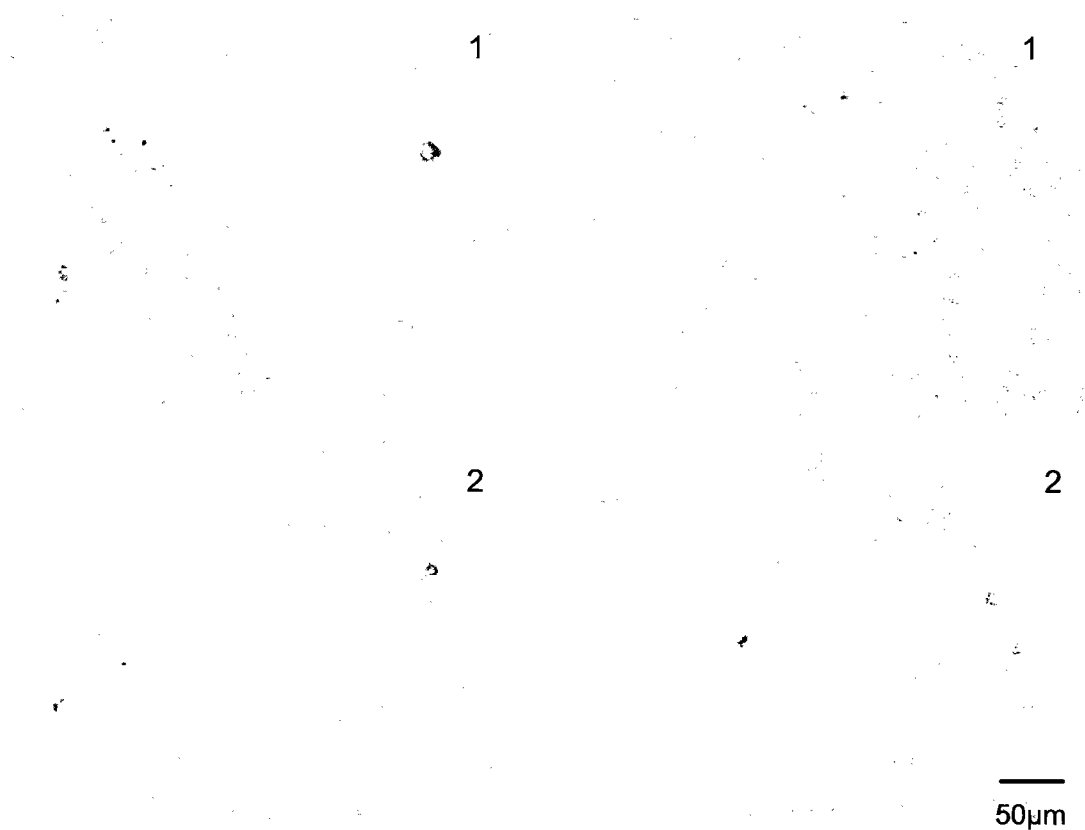
1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 20 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณ ovary ของกิ้งก่าต่อม1 *M. sintangense* ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 30 วันโดยใช้

- 1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)
- 2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)
- 3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 21 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณเหงือก (ซ้าย) และ hepatopancreas (ขวา) ของกุ้งกะต้อม *M. sintangense* ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 30 วัน โดยใช้

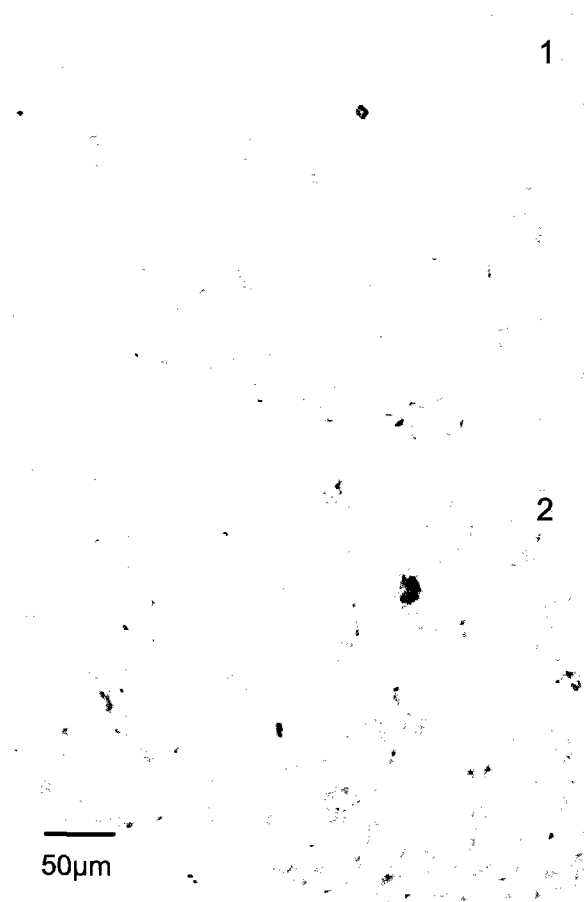
1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 22 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อ hepatopancreas (ซ้าย) และ หัวใจ (ขวา) ของกุ้งกะต้อม *M. equidens* ที่ฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วันโดยใช้

- 1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)
- 2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)
- 3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



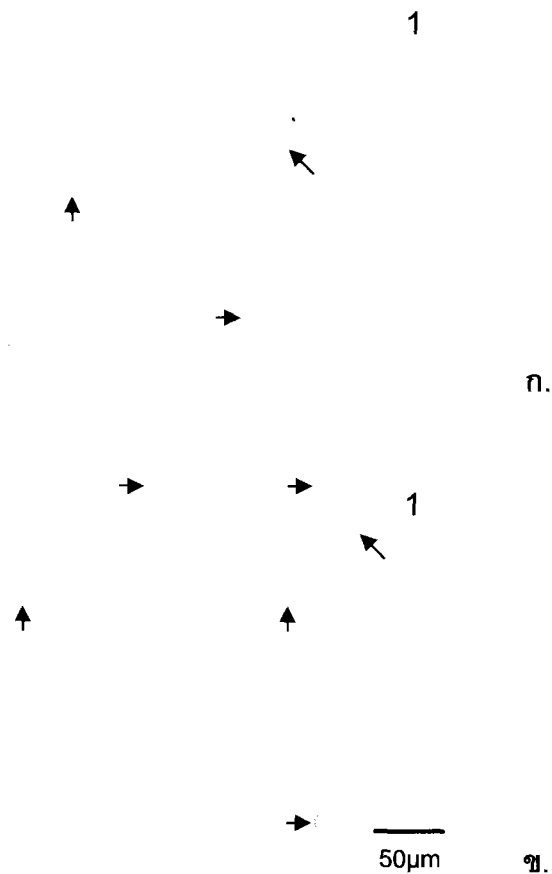
ภาพประกอบ 23 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อ
 hepatopancreas ของกิ้งกระต๋อม *M. equidens* ที่ฉีดเชื่อไวรัสโรค
 หัวเหลืองเป็นเวลา 10 วันโดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

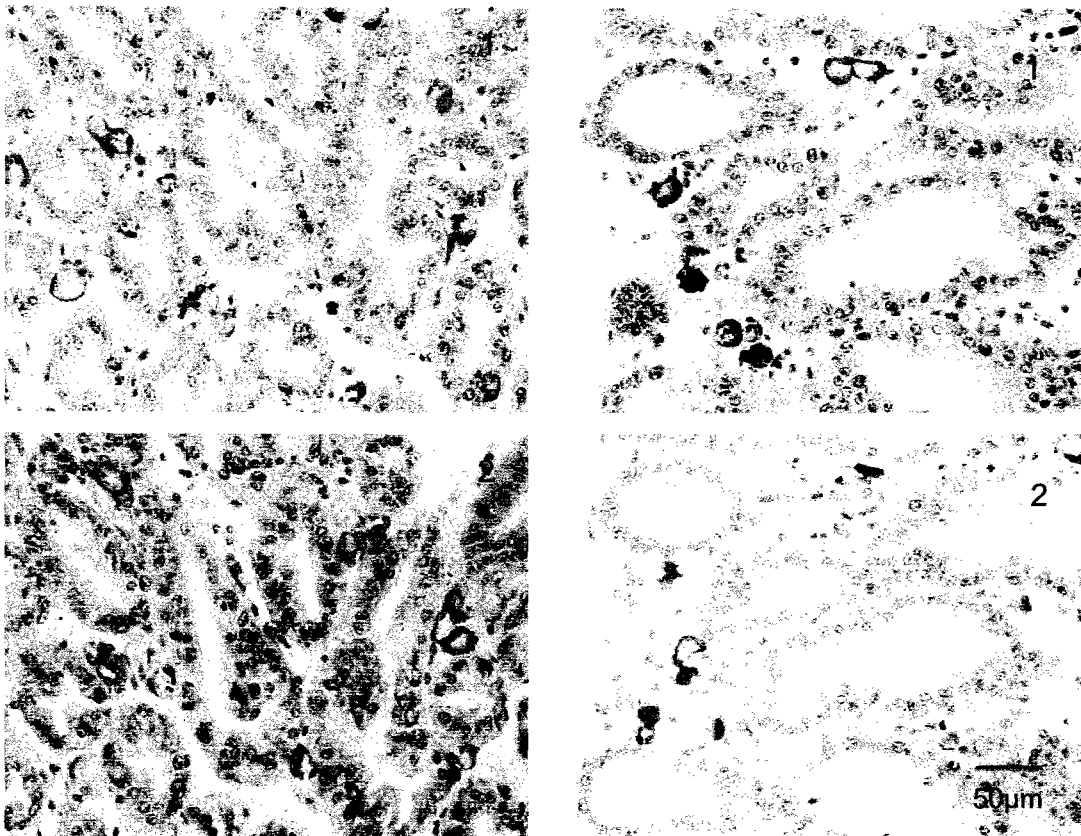
2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



ภาพประกอบ 24 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองในเนื้อเยื่อ
 บริเวณ hepatopancreas ของกุ้งฝอย *M. lanchesteri* ที่กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ
 ที่ติดเชื่อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 20 วัน
 1= โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)
 2= โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)



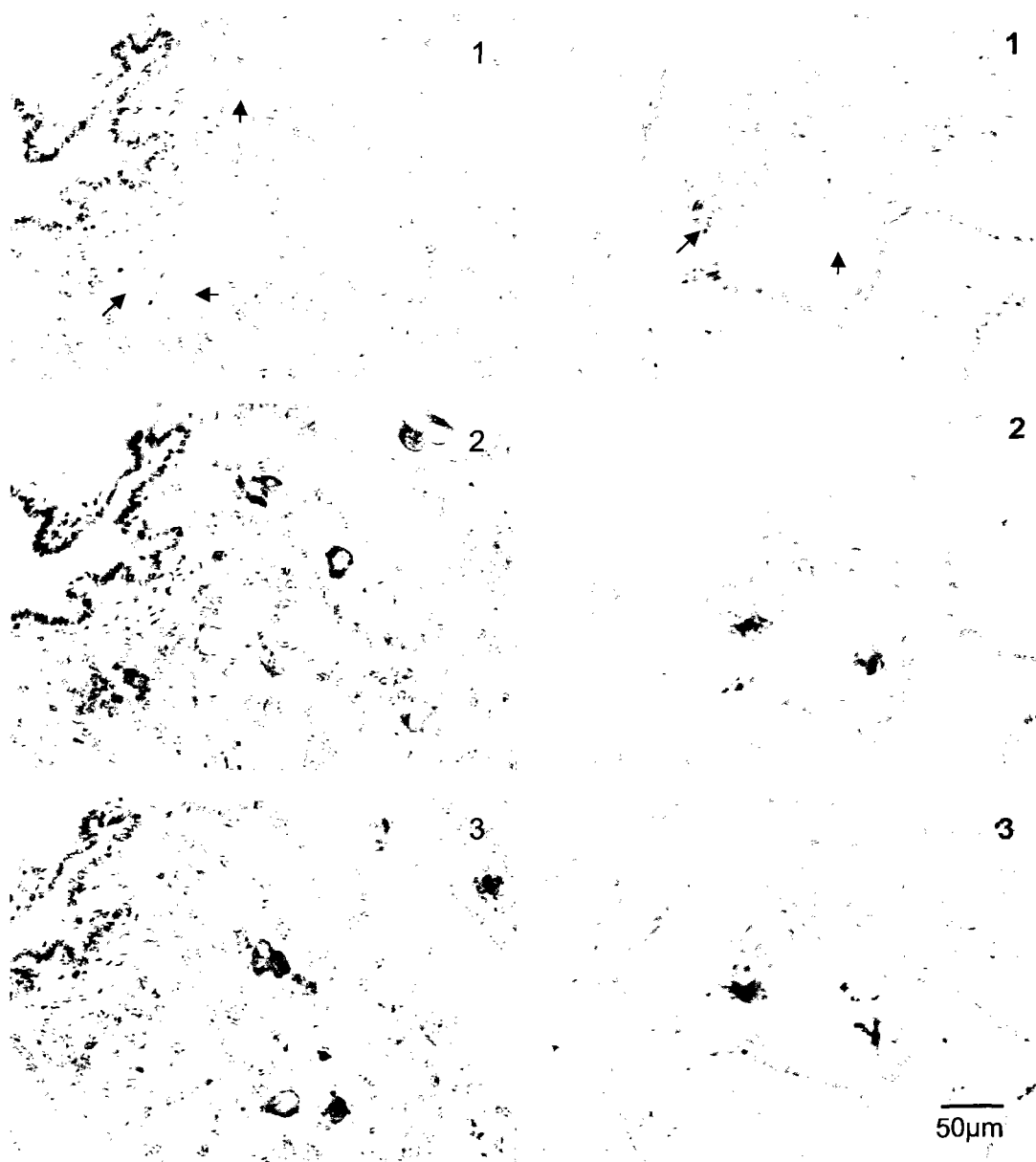
ภาพประกอบ 25 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณเนื้อเยื่อ
กล้ามเนื้อ (ก.) และ hepatopancreas (ข.) ของกุ้งฝอย *M. lanchesteri* ที่กินเนื้อเยื่อ
กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 30 วัน โดยใช้
1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)



ภาพประกอบ 26 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณ hepatopancreas (ซ้าย และขวา) ของกุ้งกะต้อม *M.sintangense* ที่กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เป็น เวลา 10 วัน โดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kD (Y19)

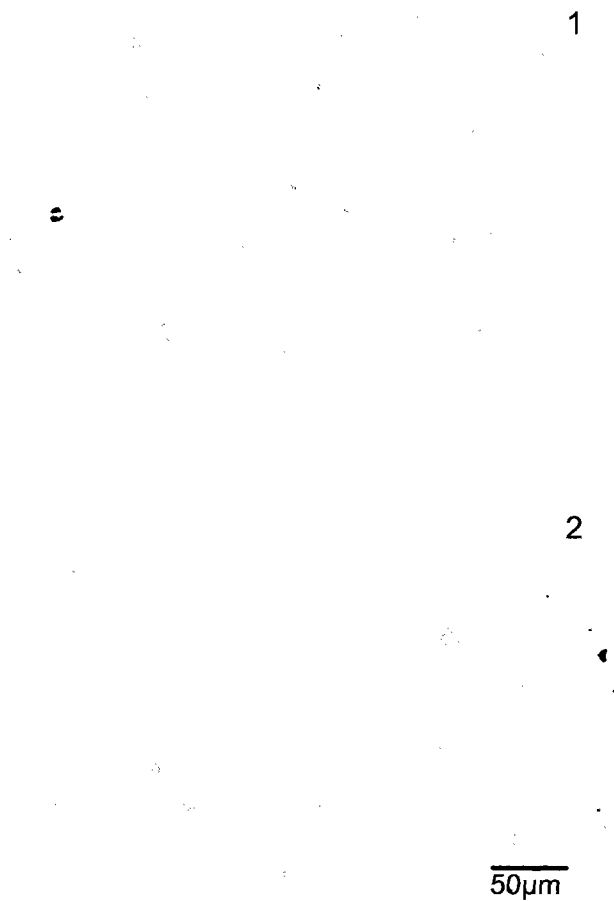


ภาพประกอบ 27 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณ hepatopancreas (ซ้าย) และ connective tissue (ขวา) ของกุ้งกะต้อม1 *M. sintangense* ที่กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง เป็นเวลา 10 วันโดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 kDa (V3-2B)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

3=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kD (Y19)



ภาพประกอบ 28 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณ
hepatopancreas ของกุ้งกะต๋อม1 *M.sintangense* ที่กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำติด
เชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 30 วันโดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kD (Y19)



ภาพประกอบ 29 Immunohistochemistry แสดงการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองบริเวณ
เนื้อเยื่อ hepatopancreas ของกุ้งกะต๋อม *M. equidense* ที่กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่
ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 5 วันโดยใช้

1=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 67 kDa (Y18-2D)

2=โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 kDa (Y19)

บทที่ 5

สรุปผล และอภิปรายผล

จากการเก็บรวบรวมกุ้งสกุล *Macrobrachium* เพื่อศึกษาติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล และอำเภอนครชัย จังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสุพรรณบุรี พบกุ้งสกุล *Macrobrachium* ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* กุ้งฝอย *M. lanchesteri* กุ้งกระต๊อม 1 *M. sintangense* และกุ้งกระต๊อม 2 *M. equidens* โดยการศึกษาเบื้องต้นได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากกุ้ง 2 ชนิดคือกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และกุ้งฝอย *M. lanchesteri* จากธรรมชาติ และจากการทดลองโดยการฉีดเชื้อด้วยไวรัสโรคหัวเหลืองเป็นเวลา 1 2 3 4 และ 5 วัน แล้วตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3 ชนิด ได้แก่ V3-2B , Y18-2D และ Y19 ซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 67 และ 22 กิโลดาลตันตามลำดับ ผลการตรวจสอบไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองซึ่งจะแสดงลักษณะเป็นตะกอนสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาแอนติเจนจับกับแอนติบอดีตามเนื้อเยื่อต่างๆในกุ้งตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด จากนั้นได้ทำการศึกษาการติดเชื้อต่อไปโดยเพิ่มระยะเวลาการทดลองให้มากขึ้นในกุ้งสกุล *Macrobrachium* ทั้ง 4 ชนิดโดยทดลองการติดเชื้อตามธรรมชาติ การติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง (ตาราง 5) ผลการทดลองไม่พบการติดเชื้อโรคหัวเหลืองในกุ้งสกุล *Macrobrachium* ทุกชนิดที่จับตามธรรมชาติ

กุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* ไม่พบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจากการทดลองโดยการฉีดในทุกช่วงเวลาที่ผ่านมาตรวจภายหลังการทำให้ติดเชื้อโดยการฉีดจากการตรวจสอบทั้งวิธี immunohistochemistry และ RT-PCR อาจเนื่องมาจากกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* นั้นมีระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองได้ สำหรับความทนทานต่อการติดเชื้อของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* นั้นได้มีงานวิจัยที่รายงานถึงความทนทานของกุ้งชนิดนี้ต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดย ฮามิด, ชาร์ลส์ และอานิลกุมาร์ (Hameed, Charles & Anilkumar 2000 : 207-213) ซึ่งได้ศึกษาการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งน้ำจืด 3 ชนิดคือ *Macrobrachium idella* *M. lamerrae* และ *M. rosenbergii* จากการทดลองโดยการฉีด การกิน และการจุ่มในไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่า *M. rosenbergii* นั้นไม่พบอาการของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเลย และยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดถึงกลไกเกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทานของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* ต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

กุ้งฝอย *M. lanchesteri* พบการติดเชื้อในวันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง หลังจากนั้นไม่สามารถตรวจพบจากการตรวจทั้งวิธี immunohistochemistry และ RT-PCR เมื่อทดลองโดยให้กินเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส พบการติดเชื้อหลังการกินวันที่ 20 และ 30 แสดงให้เห็นว่ากุ้งฝอย *M. lanchesteri* สามารถติดเชื้อไวรัสได้จากการทดลองทั้งการฉีดและโดยการกิน สำหรับการฉีดนั้นกุ้งทดลองสามารถรับเชื้อได้โดยตรงสามารถตรวจพบการติดเชื้อในวันที่ 3 แต่หลังจากนั้นไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ อาจเป็นเพราะระบบภูมิคุ้มกันที่ทำให้กุ้งมีความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อ ส่วนการทดลองโดยการกินนั้นไม่พบการติดเชื้อในระยะแรก ซึ่งอาจเป็นเพราะการทดลองโดยการกินนั้นกุ้งจะได้รับเชื้อจากเนื้อเยื่อที่กินในปริมาณที่ไม่แน่นอน ประกอบกับความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อทำให้ติดเชื้อได้ยากกว่าการทดลองโดยการกิน จากการตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry พบบริเวณอวัยวะที่มีการติดเชื้อดับและดับอ่อน กล้ามเนื้อ

กุ้งกะต้อม 1 *M. sintangense* พบการติดเชื้อในตัวอย่างหลังการฉีดเชื้อ 3 10 และ 30 วัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry และ RT-PCR การทดลองโดยการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำพบการติดเชื้อไวรัสหลังการกิน 10 20 และ 30 วัน จากการตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry บริเวณอวัยวะที่มีการติดเชื้อได้แก่ ดับและดับอ่อน กล้ามเนื้อ หัวใจ รั้งไข่ เนื้อเยื่อบุผิวใต้เปลือก และเหงือก โดยที่ปริมาณการติดเชื้อจะลดลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป หลังจากการทำให้ติดโดยการฉีด ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อ

กุ้งกะต้อม 2 *M. equidens* พบการติดเชื้อหลังการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง 3 และ 10 วัน โดยที่ปริมาณการติดเชื้อที่สังเกตได้พบว่าหลังการฉีด 3 วันนั้นเห็นผลบวกมากกว่าส่วนช่วงเวลาอื่นไม่ได้ทำการทดลองเนื่องจากมีตัวอย่างจำนวนน้อย และตายหมดก่อนครบกำหนดการสุ่มมาตรวจ ส่วนการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองโดยการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองพบการติดเชื้อในวันที่ 5

สำหรับการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี immunohistochemistry ด้วยแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด พบว่าแอนติบอดีชนิด Y18 – 2D (67 kD) และ Y19 (22 kD) นั้นให้ผลบวกชัดเจนมากที่สุด ส่วน V3 -2B (135 kD) ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบบริเวณส่วนเปลือกของไวรัส (envelope protein) จะเห็นผลบวกเล็กน้อย และไม่เห็นผลบวกในบางเนื้อเยื่อของกุ้งบางชนิดซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกลไกที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนจึงมีผลทำให้สามารถจำกัดการแพร่กระจายของไวรัสได้ และผลการทดลองโดยการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองจะมีสัดส่วนการติดเชื้อที่มากกว่าการทดลองโดยการกินซึ่งสอดคล้องการศึกษาของ ยัยนัม แวะและ (2544) ที่พบว่าการฉีดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Penaeidae มีการติดเชื้อไวรมากกว่าการให้ได้รับเชื้อโดยวิธีการให้กินเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ เนื่องจากกุ้งได้รับเชื้อไวรัสโดยตรง

จากการวิจัยครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า กุ้งสกุล *Macrobrachium* บางชนิด ที่พบตามแหล่งเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ มีแนวโน้มในการเป็นพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากให้ผลบวกจากการตรวจสอบโดยวิธี immunohistochemistry และ RT – PCR ทั้งจากการทดลองทำให้ติดเชื้อโดยการกินและฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง ได้แก่กุ้งฝอย *M. lanchesteri* กุ้งกะต้อม 1 *M. sintangense* และกุ้งกะต้อม 2 *M. equidense* โดยเฉพาะกุ้งกะต้อม 1 *M. sintangense* นั้นสามารถติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองได้ดี และภายหลังจากการรับเชื้อยังสามารถรอดชีวิตอยู่ได้นาน กุ้งฝอย *M. lanchesteri* นั้นพบการติดเชื้อภายหลังการฉีด 3 วันแต่หลังจากนั้นไม่พบการติดเชื้อเลยซึ่งการทดลองให้ผลตรงกันจากการตรวจสอบทั้ง 2 วิธี ส่วนกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* นั้นสามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองได้ดี ให้ผลลบจากการตรวจสอบทั้งวิธี immunohistochemistry และ RT – PCR อาจเนื่องมาจากกุ้งก้ามกรามมีระบบกลไกที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสหัวเหลืองก่อนที่จะเข้าสู่เซลล์ได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดเกี่ยวกับระบบกลไกที่ทำให้กุ้งก้ามกรามนั้น *M. rosenbergii* ต้านทานต่อการติดเชื้อได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่จะต้องศึกษากันต่อไปเพื่อเป็นแนวทางในการหาทางป้องกันการติดเชื้อและการระบาดของโรคกุ้งในระบบเพาะเลี้ยง

ตาราง 5 สรุปผลจากการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งที่จับจากธรรมชาติ จากการทดลองโดยการฉีดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง และจากการทดลองโดยการกินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

ระยะเวลา หลังการทำ ให้ติดเชื้อ (วัน)	ชนิดกุ้ง/การทดลอง					
	กุ้งฝอย <i>M. lanchesteri</i>		กุ้งกะต้อม 1 <i>M. sintangense</i>		กุ้งกะต้อม 2 <i>M. equidens</i>	
	ฉีดYHV	กินYHV	ฉีดYHV	กินYHV	ฉีดYHV	กินYHV
0	0/10, 0/20	0/20	0/15	0/20	0/15	0/15
3	1/10, 3/20	0/20	25/25	-	7/13	1/17
5	-	0/20	-	0/20	-	-
10	0/17, 0/20	-	20/20	4/20	1/12	0/15
20	-	4/20	-	1/20	-	-
30	0/15, 0/20	2/20	6/17	2/20	-	-

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กัลยานี ยงจินดารัตน์. (2531). การกระจายทางภูมิศาสตร์ของกุ้งและปูน้ำจืดในจังหวัดภูเก็ต และจังหวัดพังงา. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- นุชจรินทร์ เกตุนิล. (2545). "สถานการณ์ส่งออกกุ้งไทยปี 2545 และคู่แข่งที่กำลังมาแรง," *NFI Journal*. May-June 2002 : 46-55.
- พิมลพรรณ ลีละวัฒนากุล. (2518). อนุกรมวิธานของกุ้งพาลีโมนีคในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- สิทธิ บุญยรัตผลิน และคณะ. (2535). *Baculovirus* สาเหตุโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2535 กรมประมง ระหว่างวันที่ 16-19 กันยายน 2535 ณ ห้องประชุมสถาบันวิจัยประมงน้ำจืด. กรุงเทพฯ : 200-205.
- สิริ ทุกษ์วินาศ และชุดิมา ขมวิลัย. (2545, พฤษภาคม-มิถุนายน). แนวทางการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย. *วารสารการประมง* 55(3) : 219.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2547, มีนาคม). กุ้งแช่เย็น แช่แข็งรวมกุ้งปรุงแต่งทุกชนิด : ปริมาณและมูลค่าส่งออกรายเดือน. (ออนไลน์) แหล่งที่มา : www.oae.go.th/statistic/export/130/Vul-GO.xls . วันที่ 5 เมษายน 2547.
- ยัยนัป แวและ. (2544). การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ *Palaemonidae* *Penaeidae* และ *Atyidae* โดยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี. ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- รัชณี กลิ่นพุ่มซ้อน . (2545). การตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่ไวโดยวิธี *Nested RT-PCR*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีวเคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.
- Chantanachookin, C. et al. (1993). "Histology and ultrastructure reveal a granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow head diseases," *Diseases of Aquatic Organisms*. 17 : 145-157.
- Chen, L.L. et al. (2000). "Natural and experimental infection of white spot syndrome virus (WSSV) In benthic larvae of mud crab *Scylla serrata*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 40 : 157-161.

- Cowley, J. A. et al. (1999). "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). "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. J. (2002). "Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 50 : 95-104.
- Flegel, T.W. and Fegan, D.F. (1993). "Shrimp health management : An environmental approach," In presented at the Malaysian Fisheries Society Seminar "*Diseases in aquaculture the current issues*";Merlin Subang Hotel, Selangor, Malaysia;6 February 1993.p 1-17.
- Flegel, T.W. et al. (1995). "Progress in characterization and control of yellow head virus of *Penaeus monodon*," In Browdy, C. and S. Hopkins, (eds), *Swimming through trou-bled water ;Proceeding of the special session on shrimp farming, Aquaculture'95*, SanDiego, February, 1995 World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p.76-83.
- Flegel, T.W.,Boonyarapalin, S. and Withyachumnarnkul, B. (1997). "Progress in research on yellow-head virus and white spot virus in Thailand," In Flegel, T.W. and I.H. MacRae (eds), *Diseases in Aquaculture III*, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p 285-302.
- Hameed, A .S .S., Charles, M. X. and Anilkumar , M. (2000). "Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* of white spot syndrome virus," *Aquaculture*. 183 : 207-213
- Kanchanaphum, P., et al. (1998). "Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 1-7.
- Kasornchandra, J., Boonyaratapain, S. and Supamattaya, K. (1995) .Electron microscopic observation on the replication of yellow head baculovirus in lymphoid organ of *Penaeus monodon*. In *Diseases in Asian Aquaculture II*, M. Shariff , J. R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds.), Fish Health_Section, Asian Fisheries Society, pp.99-105. Manila.

- Khanobdee, K ., et al. (2002). "Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus," *Diseases of Aquatic Organisms*. 48 : 79-90.
- Lo, C.F. et al. (1996). "White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured Shrimp, crab and other arthropods," *Diseases of Aquatic Organisms*. 27 : 215-225.
- Loh, P. C., Tapay, L. M., Lu, Y. and Nadala, E. C. B. Jr. 1997." Viral pathogens of the penaeid shrimp," *Advance Virus Research*. 48 : 275-284.
- Lu, Y. et al. (1994). "Infection of the yellow head baculo-like virus(YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone)," *Fish Diseases*. 17 : 649-656.
- Lu, Y. et al. (1995). "Distribution of yellow-head virus in selected tissues and organs of penaeid shrimp *Penaeus vannamei*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 23 : 67-70.
- Lu, Y., Tapay, L.M. and Loh, P.C. (1996). "Development of a nitrocellulose-enzyme immunoassay for the detection of yellow head virus from penaeid shrimp," *Fish Diseases*. 19 : 9-13.
- Nadala, E.C.B.Jr., Tapay, L.M. and Loh, P.C. (1997). "Yellow head-virus : a rhabdovirus-like Pathogen of penaeid shrimp," *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 141-146.
- Nadala, E.C.B.Jr., et al. (1997). "Detection of yellow head virus and chinese baculovirus in Penaeid shrimp by the Western blot technique," *Journal of Virological Methods*. 69 : 39 - 44.
- Nadala, E.C.B.Jr. and Loh, P.C. (2000). "Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow head virus of penaeid shrimp," *Journal of Virological Methods*. 84 : 175-179.
- Nunan, L. M., Poulos, B. T. and Lightner, D. V. 1998. "The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp," *Aquaculture*. 160 : 19-30.
- Sittidilokratna, N ., et al. (2002). "Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus". *Diseases of Aquatic Organisms*. 50 : 87-93.

- Sithigorngul, P. et al. (2000). "Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 42 :27-34.
- Sithigorngul, P. et al. (2002). "Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 49 : 71-76.
- Supamattaya, K. et al. (1998). "Experimental transmission of white spot syndrome virus(WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*," *Diseases of Aquatic Organisms*. 34 : 1-7.
- Tang, K. F. J. and Lightner, D. V. (1999). "A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization," *Diseases of Aquatic Organisms*. 35 : 165-173.
- Wongteerasupaya, C. et al. (1995). "Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is RNA virus," *Diseases of Aquatic Organisms*. 22 : 45-50.
- Wongteerasupaya, C. et al. (1997). "Detection of yellow head virus (YHV) for *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification," *Diseases of Aquatic Organisms*. 31 : 81-186.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

Davidson's fixative

95 % Ethyl alcohol	30	มิลลิลิตร
100 % Formalin	20	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10	มิลลิลิตร
Distilled water	30	มิลลิลิตร

Phosphate buffered saline (PBS) 0.15 M, pH 7.2

NaCl	8	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1.15	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตร เป็น	1000	มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

Gelatin	1.2	กรัม
Clone alum (chromium potassium sulphate)	0.05	กรัม
Distilled water ปรับปริมาตร เป็น	100	มิลลิลิตร

สารละลาย Calf Serum 10% (P₁⁺)

Calf serum	10	มิลลิลิตร
PBS	100	มิลลิลิตร

สีย้อม Enrilich's acid hematoxylin

Hematoxylin	8	กรัม
95% Ethyl alcohol	400	มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8	กรัม
Distilled water	400	มิลลิลิตร
Glycerine	400	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400	มิลลิลิตร

สารละลาย 0.2 % Eosin Y ใน 95% Ethyl alcohol

Eosin Y	0.2	กรัม
95% Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

สารละลายของเชื้อไวรัสโรคหัดเหลือง (เจือจาง 1:500 ด้วย 2X PBS)

เชื้อไวรัสโรคหัดเหลืองที่ผ่านการกรองด้วย

กระดาษกรองปราศจากเชื้อ ขนาดรู 0.45 ไมโครมิลลิเมตร	1	ไมโครลิตร
2X PBS	499	ไมโครลิตร

สารละลาย Lysis buffer

Tris - HCl pH 9.0	50	มิลลิโมลาร์
EDTA	100	มิลลิโมลาร์
NaCl	50	มิลลิโมลาร์
2% SDS		

Working solution สำหรับตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง

ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ สัดส่วนนี้พอดีสำหรับตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง

Poly(A)carrier RNA	50	ไมโครลิตร
Binding buffer	2.5	มิลลิลิตร

Poly(A)carrier RNA

Poly(A)carrier RNA	2	มิลลิกรัม
Elution buffer	0.5	มิลลิลิตร
เก็บที่ อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส		

Binding buffer

เตรียมปริมาตร 25 มิลลิลิตร		
Guanidine – HCl	6	โมลาร์
Urea	10	มิลลิโมลาร์
Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
20 % Triton X – 100(v/v), pH4.4		

Protinase K

Lyophilized protinase K	90	มิลลิกรัม
Elution buffer	5	มิลลิลิตร
เก็บที่ อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส		

Inhibitor removal buffer

เตรียมปริมาตร 33 มิลลิลิตร

Guanidine – HCl	5	โมลาร์
Tris – HCl, pH 6.6	20	มิลลิโมลาร์
เวลาใช้จะเติมด้วย Ethanol ปริมาตร	20	มิลลิลิตร

Wash buffer

เตรียมปริมาตร 20 มิลลิลิตร

NaCl	20	มิลลิโมลาร์
Tris – HCl , pH 7.5	2	มิลลิโมลาร์
เมื่อจะใช้เติมด้วย Ethanol	40	มิลลิลิตร

Elution buffer

Nuclease free double distilled water	30	มิลลิลิตร
--------------------------------------	----	-----------

X 10 TBE buffer, pH 8.3

Tris-base	100	กรัม
Boric acid	55	กรัม
EDTA	9.5	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย กรด HCl		

Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5

Ethidium bromide	20	ไมโครลิตร
Distilled water	400	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

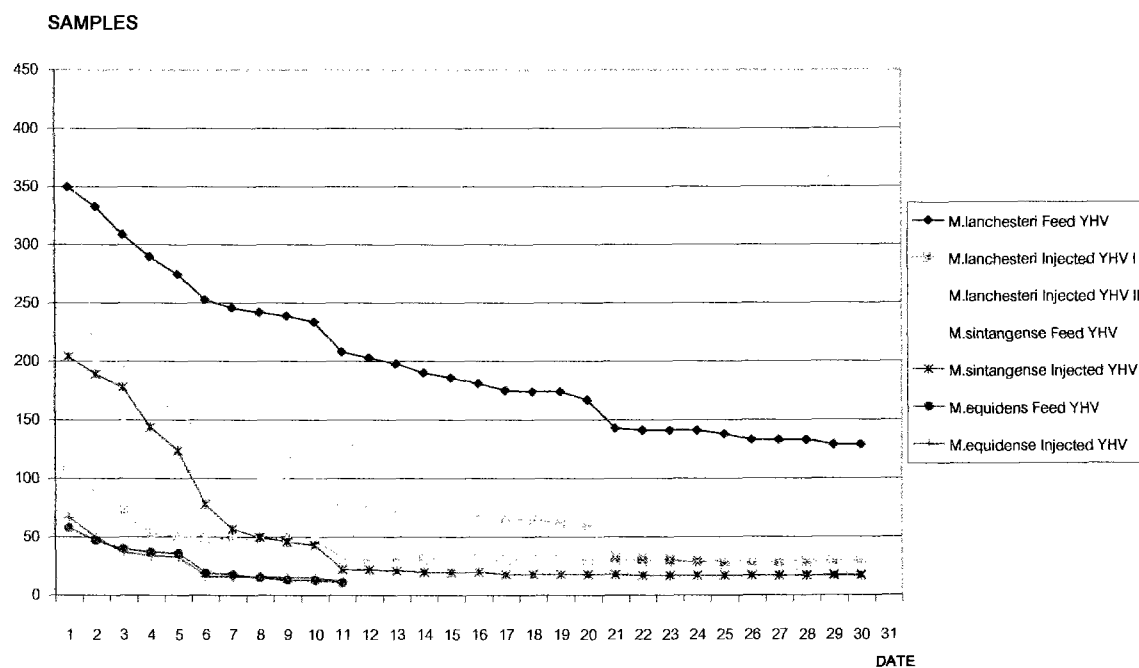
ตาราง 6 ข้อมูลการเลี้ยงกุ้งทดลอง

วันที่	<i>M.lanchesteri</i>						<i>M.sintangense</i>				<i>M.equidens</i>			
	กิน YHV		ฉีด YHV (I)		ฉีด YHV (II)		กิน YHV		ฉีด YHV		กิน YHV		ฉีด YHV	
	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ
0	-	350*	-	108*	-	400*	-	236*	-	204*	-	58*	-	67*
1	17	333	22	86	199	201	16	220	15	189	11	47	17	50
2	24	309	14	72	52	149	27	193	11	178	7	40	13	37
3	19	290	9	53	17	112	21	172	14	144	3	37	3	34
			(-10)		(-20)				(-20)					
4	15	275	3	50	4	108	15	157	20	124	1	36	1	33
5	12	253	1	49	2	106	13	134	46	78	2	19	2	16
	(-20)						(-20)				(-15)		(-15)	
6	7	246	0	49	0	106	8	126	21	57	1	18	0	16
7	4	242	0	49	5	101	7	119	7	50	3	15	0	16
8	3	239	0	49	2	99	5	114	4	46	2	13	1	15
9	5	234	1	48	1	98	6	108	3	43	0	13	0	15
10	6	208	2	31	5	73	7	81	1	22	2	11	3	12
	(-20)		(-15)		(-20)		(-20)		(-20)		(-11)		(-12)	
11	3	203	0	31	4	69	3	78	0	22	-	-	-	-
12	5	198	0	31	0	69	4	74	1	21	-	-	-	-
13	8	190	0	31	3	66	1	73	1	20	-	-	-	-
14	4	186	0	31	1	65	2	71	0	20	-	-	-	-
15	5	181	0	31	0	65	1	70	0	20	-	-	-	-
16	6	175	1	30	0	65	3	67	2	18	-	-	-	-
17	2	174	0	30	1	64	2	65	0	18	-	-	-	-
18	0	174	0	30	0	64	4	61	0	18	-	-	-	-
19	7	167	0	30	1	63	3	58	0	18	-	-	-	-
20	4	143	0	30	4	39	5	33	0	18	-	-	-	-
	(-20)				(-20)		(-20)							
21	2	141	1	29	2	37	2	32	1	17	-	-	-	-

ตาราง 6 (ต่อ) ข้อมูลการเลี้ยงกึ่งทดลอง

วันที่	<i>M.lanchesteri</i>						<i>M.sintangense</i>				<i>M.equidens</i>			
	กิน YHV		ฉีด YHV (I)		ฉีด YHV (II)		กิน YHV		ฉีด YHV		กิน YHV		ฉีด YHV	
	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ	ตาย	เหลือ
22	0	141	0	29	0	37	1	31	0	17	-	-	-	-
23	0	141	0	29	0	37	2	29	0	17	-	-	-	-
24	3	138	0	29	0	37	4	25	0	17	-	-	-	-
25	5	133	0	29	0	37	1	24	0	17	-	-	-	-
26	0	133	0	29	1	36	2	22	0	17	-	-	-	-
27	0	133	0	29	1	35	1	21	0	17	-	-	-	-
28	4	129	0	29	0	35	3	18	0	17	-	-	-	-
29	0	129	0	29	0	35	0	18	0	17	-	-	-	-
30	0	129	0	29	0	35	0	18	0	17	-	-	-	-
	(-20)		(-15)		(-20)		(-18)		(-17)					

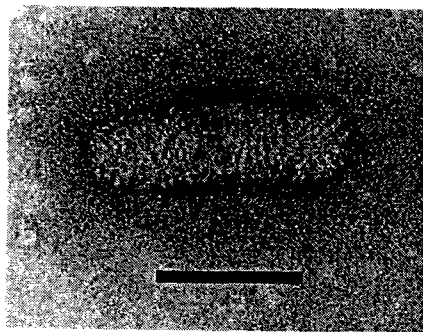
หมายเหตุ * หมายถึงจำนวนกึ่งทดลองเริ่มต้นหลังการฉีดหรือกิน YHV



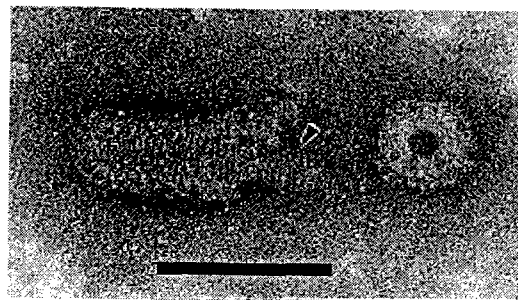
ภาพประกอบ 30 จำนวนกึ่งที่เหลือตลอดช่วงเวลาในการทดลอง 30 วัน

ภาคผนวก ค

Yellow-Head Virus



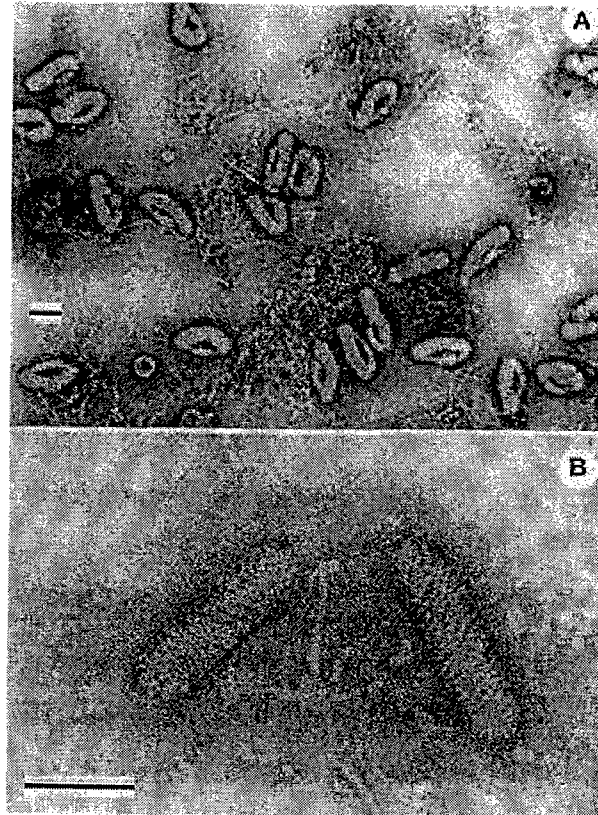
Negatively-stained YHV particle.
Bar is 100 nm.



Negatively-stained partially degraded YHV particle
showing the helical nucleocapsid (arrow) and lipid
micelle from the viral envelope. Bar is 100 nm.

(<http://www2.hawaii.edu/%7epilip/yhv.htm>)

Yellow-Head Virus



A and B magnification electron micrographs of negatively-stained YHV particles. Bars are 100 nm.

(<http://www2.hawaii.edu/%7epilip/yhv1.htm>)

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวสุดา ชูถิ่น
วันเดือนปีเกิด	24 มกราคม 2513
สถานที่เกิด	อำเภอบ้านแพรก จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	อาคารคีตลาการ ห้อง 513 สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ถ.อิสรภาพ ช.อิสรภาพ 15 แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	อาจารย์ 1 ระดับ 5
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ถ.อิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600
ประวัติการศึกษา	ประถมศึกษา จากโรงเรียนวัดพรหมประสิทธิ์ อ.ตะพานหิน จ.พิจิตร
พ.ศ. 2528	จากโรงเรียนวัดพรหมประสิทธิ์ อ.ตะพานหิน จ.พิจิตร
พ.ศ. 2529	มัธยมศึกษาตอนต้น
พ.ศ. 2532	จากโรงเรียนวินิตศึกษา อ.เมือง จ. ลพบุรี มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทย์ – คณิต)
พ.ศ. 2536	จากโรงเรียนพิบูลวิทยาลัย อ.เมือง จ. ลพบุรี วท.บ. (เทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการ) จากมหาวิทยาลัยจากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มหาสารคาม
พ.ศ. 2547	วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพฯ