



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาการเกิดโรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow-head virus; YHV) ในกุ้งขาวแวนนาไม และพาหะบางชนิด  
Pathogenesis of Yellow-head Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Some Carriers

นามผู้วิจัย นางสาวอภิฤดี สงสุข

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( รองศาสตราจารย์ชลอ ลิมสุวรรณ, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาการเกิดโรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow-head virus;YHV) ในกุ้งขาวแวนนาไม  
และพาหะบางชนิด

Pathogenesis of Yellow-head Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)  
and Some Carriers

โดย

นางสาวอภิญญา สงสุข

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

พ.ศ. 2554

อภิฤดี สงสุข 2554: การศึกษาการเกิดโรคไวรัสหัวเหลือง(Yellow-head virus;YHV) ในกุ้งขาว  
แวนนาไมและพาหะบางชนิด ปรินญาปรัชญาคุณฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง สาขาวิทยาศาสตร์  
การประมงภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของศาสตราจารย์ชอล ลี้มสุวรรณ  
Ph.D. 130 หน้า

การศึกษาการเกิดโรค ไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) และชนิดของพาหะ  
โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างสัตว์ชนิดต่าง ๆ จากฟาร์มที่เลี้ยงกุ้งด้วยน้ำความเค็มต่ำในจังหวัดราชบุรี จำนวน  
ทั้งสิ้น 29 ฟาร์ม ยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิคRT-PCR, histopathology และ immunohistochemistry  
ผลการศึกษาพบสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในธรรมชาติทั้งสิ้น ๓ ชนิด คือ ปูนา (*Sommaniathelphusa germaini*), กุ้ง  
ก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) และ กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) เมื่อนำเชื้อไวรัสที่ตรวจพบมา  
จำแนกชนิดโดยวิธีการทางชีวโมเลกุล พบว่า เป็นไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ YHV1-b ส่วนการทดลองใน  
ห้องปฏิบัติการจะนำสัตว์ที่พบว่าสามารถเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลืองทั้ง 3 ชนิดมาศึกษาการเกิดโรค ยืนยันผล  
การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค RT-PCR, histopathology และ immunohistochemistry โดยแบ่งการทดลอง  
ออกเป็น 5 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสในสัตว์กลุ่มพาหะ  
ได้แก่ปูนา กุ้งก้ามกราม และกุ้งฝอย โดยในปูนาและกุ้งก้ามกรามจะใช้วิธีฉีดเชื้อส่วนกุ้งฝอย จะใช้วิธีการแช่เชื้อจาก  
การศึกษาพบว่า สัตว์ทั้ง 3 ชนิด มีความทนทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยไม่แสดงอาการของโรค และไม่พบการ  
ตายของสัตว์ทดลองโดยกุ้งก้ามกรามและปูนาที่ได้รับเชื้อสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้หมดภายในเวลา ๒๘ วัน  
ในขณะที่กุ้งฝอยสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ภายในเวลา 21 วัน การทดลองที่ 2 ใช้วิธีทำให้ติดเชื้อโดยให้สัตว์  
พาหะกินกุ้งขาวที่มีเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากผลการทดลองพบว่าสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิดติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการ  
ตรวจด้วยวิธี RT-PCR และไม่พบการตายของสัตว์ทั้ง 3 ชนิด เช่นเดียวกับในการทดลองที่ 1 โดยกุ้งก้ามกรามและปูนา  
ที่ได้รับเชื้อสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้หมดภายในเวลา 28 วัน ในขณะที่กุ้งฝอยสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัว  
เหลืองได้ภายในเวลา 21 วัน ตามลำดับ การทดลองที่ 3 เป็นการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากพาหะสู่  
กุ้งขาวแวนนาไมโดยวิธีการเลี้ยงสัตว์พาหะร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม ผลการศึกษาพบว่า สัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิดสามารถ  
ถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังกุ้งขาวแวนนาไมได้ การทดลองที่ 4 ศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสหัว  
เหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมเมื่อได้รับเชื้อโดยวิธีการให้สัตว์พาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากผลการทดลองพบว่า  
สัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิด สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อ และการตายในกุ้งขาว ได้ การทดลองที่ 5 เป็นการศึกษาความ  
รุนแรงของการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไม โดยวิธีการฉีดเชื้อและให้กินเชื้อแล้วนำไปเลี้ยงที่ร ะดับ  
ความเค็ม 5, 15 และ 30 พีพีที ผลการทดลองพบว่ากุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 5 พีพีที จะมีอัตราการตายที่รวดเร็วกว่ากุ้ง  
ที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 15 และ 30 พีพีที ตามลำดับ

---

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Apiruedee Songsuk 2011: Pathogenesis of Yellow-head Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Some Carriers. Doctor of Philosophy (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 130 pages.

A study was conducted on the pathogenesis of yellow head virus (YHV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) focusing the carriers involved on disease pathogenesis by surveying and collection of samples from 29 shrimp farms of low salinity culture area in Ratchaburi province. The infection of the virus was confirmed by RT-PCR, histopathology and immunohistochemistry technique. Three crustacean species namely fresh water crab (*Somanniathelphusa germaini*), giant fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergi*) and Lanchester's fresh water prawn (*Macrobrachium lanchesteri*) have been detected as carrier of the virus as these species harbour the infection for considerable periods without showing any clinical sign. The study revealed the presence of YHV type 1-b by molecular method. The infection of carrier was also determined and confirmed by the same technology as was done in white shrimp. The study was divided in to five experiments. In experiment 1, among the 3 species of carriers, fresh water crab and giant fresh water prawn were infected by injecting the virus while Lanchester's prawn were infected by immersion method. All the animals showed no mortality or clinical sign of infection and first 2 could eliminate the virus after 28 days and 3<sup>rd</sup> one get rid of the virus after 21 days. In experiment 2, the three carriers fed the infected (YHV infected) *L. vannamei* to establish the infection and the infection was confirmed by previous method. The result was same as showed in experimental 1, that no mortality or clinical sign exhibited and the virus was eliminated after a certain periods (mentioned before). In experiment 3, it was observed that there was successful transmission of virus from carriers to *L. vannamei* culture. The experiment 4 was about the establishment of infection in *L. vannamei* by feeding the infected carriers. The results obtained from the study indicated that 3 species of carriers can establish the infection and mortality in *L. vannamei*. The experiment 5 was determined the severity of YHV infection in *L. vannamei* by injection and feeding at different salinity levels (5, 15 and 30 ppt). Similar results were observed which the mortality in the low salinity group (5ppt) was faster than those of 15 and 30 ppt groups respectively.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

\_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชลอ ลีมสุวรรณ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิตติ ชูเชิด กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร. เต็มดวง สมศิริ และ ดร. พุทธิรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง ที่ให้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำในการตรวจวิเคราะห์ชนิดของไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี RT-PCR ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล ลิทธิกรกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ขอขอบคุณคุณปิยนุช พรหมภร และ คุณคณิตดา ทองขาว ที่ให้ความช่วยเหลือในการย้อมสีเนื้อเยื่อ และขอขอบพระคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทั้ง 29 ฟาร์ม ในจังหวัดราชบุรีที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างในการวิจัย

ขอกราบพระคุณ บิดา มารดา รวมทั้งพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ทุกคนในศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่ได้ให้การสนับสนุนการศึกษาและเป็นกำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงจนจบการศึกษาในครั้งนี้

การวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

อภิฤดี สงสุข

พฤษภาคม 2554

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	42
สรุปและข้อเสนอแนะ	93
สรุป	93
ข้อเสนอแนะ	94
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	95
ภาคผนวก	106
ภาคผนวก ก ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ	107
ภาคผนวก ข ผลการตรวจตัวอย่างสัตว์พาหะทั้ง 29 ฟาร์ม	118
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	130

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สัตว์ในกลุ่มคริสเตเซียนหลายชนิดที่สามารถติดเชื้อ YHV	19
2	รายละเอียดของไพรเมอร์และปริมาณของส่วนประกอบใน RT-PCR	23
3	รายละเอียดของไพรเมอร์และปริมาณของส่วนประกอบใน PCR รอบที่สอง	24
4	พิกัดที่ตั้งของแต่ละฟาร์มในจังหวัดราชบุรี	42
5	แสดงชนิดและจำนวนของสัตว์ที่ทำการสำรวจ และสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในฟาร์ม	51
6	อัตราการตายและการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของสัตว์ทดลองหลังจากผ่านการฉีดและแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน	55
7	อัตราการตายของสัตว์ทดลองหลังจากให้กินกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน	56
8	จำนวนของกึ่งขาวแวนนาไม่ที่ตายหลังจากเลี้ยงร่วมกับสัตว์พาหะทั้งสามชนิดที่ติดเชื้อ YHV เป็นเวลา 7 วัน	58
9	ผลตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งขาวแวนนาไม่หลังจากเลี้ยงร่วมกับสัตว์พาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 7 วัน ด้วยวิธี RT-PCR	59
10	จำนวนของกึ่งขาวแวนนาไม่ที่ตายหลังจากให้กึ่งขาวแวนนาไม่กินปูนา, กุ้งก้ามกรามและกึ่งฝอยที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน	61
11	ผลตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองหลังจากให้กึ่งขาวแวนนาไม่กินปูนา, กุ้งก้ามกรามและกึ่งฝอยที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน ด้วยวิธี RT-PCR	62
12	อัตราการรอดตายของกึ่งขาวแวนนาไม่ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ หลังฉีดเชื้อ YHV	66
13	อัตราการรอดตายของกึ่งขาวแวนนาไม่ที่ระดับความเค็มต่าง ๆ หลังให้กินกึ่งที่มีเชื้อ YHV	68

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข1	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 1 และ 2	119
ข2	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 3 และ 4	120
ข3	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 5,6 และ 7	121
ข4	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 8	122
ข5	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 9	123
ข6	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 8 และ 9	124
ข7	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 10,11, 12 และ 13	125
ข8	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 14-19	126
ข9	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 20-24	127
ข10	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 24	128
ข11	ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 25-29	129

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ฟาร์มที่ทำการเก็บตัวอย่างสัตว์พาหะในจังหวัดราชบุรี	38
2	การลำเลียงสัตว์พาหะจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งจังหวัดราชบุรี	38
3	การเลี้ยงสัตว์พาหะที่มีเชื้อ YHV (ปูนา) ในตู้กระจก	39
4	การทำให้สัตว์พาหะ (ปูนา) ติดเชื้อไวรัส YHV โดยวิธีการฉีดเชื้อ	39
5	กุ้งฝอยที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสโดยให้กินกุ้งขาวที่มีเชื้อ YHV	40
6	การทดลองเลี้ยงสัตว์พาหะที่มีเชื้อ YHV ร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม	40
7	การหยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนเนื้อเยื่อในเทคนิค immunohistochemistry	41
8	การนำเนื้อเยื่อมาย้อมด้วยสี eosin ในเทคนิค immunohistochemistry	41
9	แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างจากฟาร์มทั้ง 29 ฟาร์มในจังหวัดราชบุรี	44
10	กุ้งก้ามกราม ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	49
11	กุ้งฝอย ( <i>Macrobrachium lanchesteri</i> )	50
12	ปูนา ( <i>Somanniathelphusa germaini</i> )	50
13	การทำ Alignment ของลำดับเบสของ envelope structural glycoprotein ยีนของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ทำการศึกษาในครั้งนี้กับ เชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ 1a ที่ระบาดในประเทศไทย (EF156405, FJ848673) และเชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ 1b ที่พบระบาดในกุ้งขาวแวนนาไมของไทย (FJ194949)	54
14	กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง(บน)จะพบบริเวณส่วนหัวมีสีเหลืองชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ (ล่าง)	65
15	อัตราการตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเค็มต่าง ๆ หลังฉีดเชื้อ YHV	67
16	อัตราการตายกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเค็มต่าง ๆ หลังให้กินกุ้งที่มีเชื้อ YHV	69
17	พยาธิสภาพ lymphoid organ ของกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ YHV ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ พบ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้สีแดง) และ karyorrhexis (ลูกศรชี้สีเหลือง) ของเซลล์จำนวนมาก (H&E, bar = 50.0µm)	66

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	<p>การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&amp;E) (18A) พบเซลล์บริเวณ lymphoid organ ของกึ่งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) (bar = 200µm) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunihistochemistry (18B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ตัดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200µm)</p>	75
19	<p>การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&amp;E) (19A) พบเซลล์บริเวณ lymphoid organ ของกึ่งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei แทรกอยู่จำนวนมาก (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunihistochemistry (19B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ตัดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 500µm)</p>	76
20	<p>พยาธิสภาพของเหงือกกึ่งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ YHV ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ พบการบวมน้ำและพบ basophilic cytoplasmic inclusion ตัดสีน้ำตาลจากการย้อมด้วยสี (H&amp;E, bar = 20.0µm)</p>	77
21	<p>การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&amp;E) (21A) พบเซลล์บริเวณเหงือกกึ่งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunihistochemistry (21B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ตัดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200µm)</p>	78
22	<p>การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&amp;E) (22A) พบลักษณะ basophilic cytoplasmic inclusion ตัดสีน้ำตาลเข้มใน เซลล์บุผิวเหงือกและเซลล์เม็ดเลือดของกึ่งขาวที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunihistochemistry (22B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ตัดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 100µm)</p>	79

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	พยาธิสภาพของตับและตับอ่อนกึ่งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ YHV ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ พบ pyknotic nuclei ที่ interstitial cells จำนวนมาก (ลูกศรชี้) (H&E, bar = 50.0µm)	80
24	การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (24A) พบเซลล์บริเวณ interstitial cells ของตับและตับอ่อนกึ่งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei จำนวนมาก (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (24B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200µm)	81
25	การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (25A) พบลักษณะ pyknotic nuclei ในเนื้อเยื่อบริเวณ interstitial cells ของตับและตับอ่อนกึ่งขาวที่ติดเชื้อ (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (25B) พบการติดเชื้อ YHV ซึ่งติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV ในบริเวณดังกล่าว (ลูกศรชี้) (bar = 500µm)	82
26	แสดงการตายของเซลล์เม็ดเลือดมีลักษณะ pyknotic nuclei และ karyorrhexis (ลูกศรชี้) บริเวณ interstitial cells ของ ตับและตับอ่อนและในอวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกึ่งขาวที่ติดเชื้อ YHV (H&E) (26A) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (26B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200µm)	83
27	แสดงการตายของเซลล์ epidermis และการเสื่อมของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณชั้นใต้เปลือกของกึ่งขาวที่ติดเชื้อ (H&E) (27A) (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (27B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 100µm)	84

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (28A) พบเซลล์กล้ามเนื้อของกึ่งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (28B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200µm)	85
29	พยาธิสภาพกล้ามเนื้อหัวใจของกึ่งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ YHV ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำพบ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) (H&E, bar = 50.0µm)	86
30	แสดงการตายของเซลล์เม็ดเลือดในบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจของกึ่งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) (H&E) (30A) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (30B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 500µm)	87
31	การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (31A) พบการตายของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกึ่งขาวที่ติดเชื้อ (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (31B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200µm)	88
32	การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (32A) บริเวณเหงือกของปูนาที่ติดเชื้อไม่พบความผิดปกติ แต่เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (32B) พบการติดเชื้อ YHV ในบริเวณดังกล่าวโดยพบการติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 50.0µm)	89

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
33	<p>การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&amp;E) (33A) บริเวณเหงือกของปูนา ไม่พบความผิดปกติแต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunihistochemistry (33B) พบการติดเชื้อ YHV ในบริเวณดังกล่าวโดยพบการติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200<math>\mu</math>m)</p>	90
34	<p>แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนของกิ้งก่ามกรามที่ได้รับเชื้อ YHV ซึ่งไม่พบความผิดปกติ (H&amp;E) (34A) แต่เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunihistochemistry (34B) พบ การติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยพบการติดสีน้ำตาลของ โมโน โคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV ในเซลล์ดังกล่าว (ลูกศรชี้) (bar = 100<math>\mu</math>m)</p>	91
35	<p>การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&amp;E) (35A) ไม่พบว่ามีการผิดปกติของเซลล์บริเวณเหงือกของกิ้งก่าฝอย แต่เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunihistochemistry (35B) พบการติดเชื้อ YHV โดยพบการติดสีน้ำตาลของ โมโน โคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV ในเซลล์ดังกล่าว (ลูกศรชี้) (bar = 100<math>\mu</math>m)</p>	92

## การศึกษาการเกิดโรคไวรัสหัวเหลือง (Yellow-head virus; YHV) ในกุ้งขาวแวนนาไม และพาหะบางชนิด

### Pathogenesis of Yellow-head Virus in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Some Carriers

#### คำนำ

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยง สัตว์น้ำในประเทศไทยได้ขยายตัวเพิ่มอย่างรวดเร็ว เพื่อทดแทนปริมาณสัตว์น้ำที่ลดลงในธรรมชาติและความต้องการของผู้บริโภคที่นิยมบริโภคสัตว์น้ำมากขึ้น โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งผลิตส่วนใหญ่ เพื่อการส่งออกยังต่างประเทศและสามารถทำรายได้ให้กับประเทศเป็นมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาทจนถึง แสนล้านบาทต่อปี ทำให้ประเทศไทยเป็นผู้นำด้านการผลิตและการส่งออกกุ้งรายใหญ่ที่สุดของโลกอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535-2545 อย่างไรก็ตามตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 เป็นต้นมา การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ประสบปัญหากุ้งโตช้า ให้ผลผลิตต่ำ เรียกว่า กลุ่มอาการกุ้งกุ ลาดำเจริญเติบโตช้า (Monodon slow growth syndrome; MsGs (Chayaburakol *et al.*, 2004; Flegel, 2006) กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงอนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อเข้ามาในประเทศ ตั้งแต่วันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2545 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2546 ซึ่งพบว่าการทดลองเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของเกษตรกรให้ผลค่อนข้างดี จึงมีเกษตรกรจำนวนมากเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น และทำให้มีการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้เพิ่มขึ้นในทุกพื้นที่ (ชลอและพรเลิศ, 2547) เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมได้ผ่านการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลานาน ทำให้เลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ขนาดใกล้เคียงกัน สามารถเลี้ยงได้ในอัตราความหนาแน่นสูง ทำให้ได้ผลผลิตสูง จากข้อมูลสถิติ ในปีพ.ศ. 2549 พบว่าผลผลิตการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมมีจำนวนมากถึงประมาณ 500,000 ตัน ในขณะที่ กุ้งกุลาดำมีผลผลิตประมาณ 20,000 ตันเท่านั้น ซึ่ง แนวโน้มการเลี้ยงกุ้งขาว แวนนาไม ยังคงได้รับความนิยมอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งปัจจุบันซึ่ง ในปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยสามารถผลิตกุ้ง ขาวแวนนาไม ได้ประมาณ 635,000 ตัน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 99 เปอร์เซนต์ ของผลผลิตกุ้งทั้งหมด (สมศักดิ์, 2554)

ถึงแม้ว่าอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมของไทยมีการเจริญเติบโต อย่างรวดเร็ว แต่ปัญหาเกี่ยวกับโรคระบาดในกุ้งก็เริ่มมีความรุนแรงขึ้นตามไปด้วย โดยเฉพาะ โรคที่มีสาเหตุจากเชื้อ

ไวรัส ซึ่งไม่สามารถรักษาด้วยยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีใด ๆ ทั้งสิ้นเช่น โรคดวงขาวซึ่งเกิดจาก ไวรัสดวงขาว (White Spot Syndrome Virus; WSSV) และ โรคหัวเหลือง (Yellow Head Disease; YHD) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง (Yellow - Head Virus; YHV) เป็น RNA ไวรัสสายเดี่ยว (ssRNA) พบรายงานการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาในประเทศไทย (Limsuwan, 1991; Wongteerasupaya *et al.*, 1995) ต่อมาพบระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้งทั่วทวีปเอเชีย (Albaladejo *et al.*, 1998 ; Walker *et al.*, 2001) และในแถบอเมริกา (Lightner *et al.*, 1997) Flegel (1997) รายงานว่าพบการระบาดของโรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ.2535-2536 โดยกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคไวรัสหัวเหลืองจะมีอัตราการตายที่รวดเร็วและรุนแรง กุ้งที่ติดเชื้อจะมีลักษณะอาการส่วนหัวเป็นสีเหลือง มีการกินอาหารมากผิดปกติระยะหนึ่งก่อนที่จะพบกุ้งป่วยและตายอย่างรวดเร็วเป็นจำนวนมาก ชลอ (2543) รายงานว่าการ ป้องกันการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองนั้นสามารถทำได้โดยการใช้ลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อไวรัสและเลี้ยง โดยใช้ระบบปิด ใช้สารเคมีที่มีประสิทธิภาพเพื่อฆ่าเชื้อไวรัสพร้อมทั้งพาหะของโรคที่ปนเปื้อนมากับน้ำ ก่อนปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยง วิธีนี้สามารถป้องกันการระบาดของโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพจนทำให้การระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำลดลงมาก อย่างไรก็ดีหลังจากที่กรมประมงอนุญาตให้มีการ นำกุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อ เข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2545 ต่อมาในปี พ.ศ. 2549 พบรายงานการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลือง อีกครั้ง ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว แวนนาไม ในพื้นที่ภาคกลางที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำและระบบการระบายน้ำไม่ดี ไม่มีบ่อบักน้ำ (ปิยนุช, 2550) กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะพบได้ตั้งแต่อายุ 40 ถึง 60 วัน หลังจากปล่อยลูกกุ้งลงเลี้ยงโดยอัตราการตายของกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะมีอัตราการตายช้ากว่าการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ และไม่พบการกินอาหารเพิ่มมากกว่าปกติติดต่อกันหลายวันก่อนที่กุ้งจะป่วยดังที่เคยมีรายงานในกุ้งกุลาดำ(ชลอ, 2543) อีกทั้งกุ้งที่ป่วยก็ไม่แสดงอาการตับและตับอ่อน (hepatopancreas) มีสีเหลืองอย่าง ชัดเจนเหมือนกับที่พบในกุ้งกุลาดำ แต่จะมีการตายแบบทยอยตายไปเรื่อย ๆ ทำให้ต้องใช้เวลาหลายวันจึง จะทราบว่า กุ้งป่วยจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและ เมื่อมีการระบายน้ำออกจากฟาร์ม จึงส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลือง แพร่กระจายมากขึ้น สร้างความเสียหายอย่างมาก สำหรับโรคไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไม มีรายงาน ตั้งแต่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ราชบุรี ไปจนถึงจังหวัดนครปฐมตั้งแต่ พ.ศ. 2549 จนถึงปัจจุบัน ผลจากการศึกษา โดย Sittidilokratana *et al.*(2009) และ Senapin *et al.*(2010) พบว่าไวรัสหัวเหลืองที่ระบาด ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ เรียกว่า YHV-1b ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ YHV-1a ที่เคยพบระบาดในกุ้งกุลาดำของไทย โดยไวรัส YHV-1b นี้จะขาดยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน gp116 ไป ทำให้มีอะมิโนอะซิด สั้นกว่า YHV-1a ไป 54 อะมิโนอะซิด และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าเพราะเหตุใดการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลือง

ในครั้งนี้อาจจัดบริเวณเฉพาะในพื้นที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำเท่านั้น เนื่องจากเกษตรกรในพื้นที่นี้ ส่วนใหญ่จะเป็นเกษตรกรรายย่อยซึ่งขาดความรู้ ความเข้าใจในการป้องกันโรคที่ดี ส่วนใหญ่เลี้ยง โดยไม่มีบ่อพักน้ำ อีกทั้งยังไม่มีเงินทุนเพียงพอในการใช้สารเคมีที่มี ประสิทธิภาพสูงแต่มีราคาแพง เพื่อฆ่าเชื้อในน้ำและพาหะก่อนปล่อยลูกกุ้งดังที่เคยประสบความสำเร็จในการแก้ปัญหาการระบาดของ ไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ ดังนั้นการศึกษาอย่างละเอียดถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการระบาดของ เชื้อไวรัสหัวเหลืองในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม โดยเฉพาะการศึกษาชนิดของพาหะ อนุเชื้อ ไวรัสที่อยู่ในพื้นที่และการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ทราบถึงความสามารถและระยะเวลาใน การกำจัดเชื้อไวรัสของพาหะแต่ละชนิดตลอดจนความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากพาหะ แต่ละชนิด ไปยังกุ้งขาวแวนนาไม จึงมีความสำคัญต่อการแก้ปัญหาการเกิดโรคไวรัสหัวเหลือง ซึ่ง ระบาดในการเลี้ยงกุ้งขาวในพื้นที่ภาคกลางในปัจจุบัน เป็นอย่างมาก ถึงแม้ที่ผ่านมาจะมีผู้รายงาน เกี่ยวกับชนิดของพาหะของเชื้อไวรัสหัวเหลืองมาแล้วเป็นจำนวนมาก (Lightner *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1994, 1997) แต่การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการทดลองทำให้ติดเชื้อในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ยังไม่ มีการตรวจพบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในสัตว์น้ำที่อยู่ในธรรมชาติในพื้นที่ที่พบการระบาดของโรค อีกทั้งยังไม่พบว่ามีงานวิจัยใดที่ให้คำตอบได้ว่าพาหะของเชื้อไวรัสที่ทำการศึกษานั้นสามารถกำจัด ไวรัสชนิดนี้ที่อยู่ในตัวได้หรือไม่ ถ้าได้ใช้เวลานานานเท่าใดและพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัส ในตัวไปยังกุ้งขาวแวนนาไมได้ นานเท่าใด ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ จะสามารถใช้ วางแผนเพื่อป้องกันและแก้ปัญหาการระบาดของโรคหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไม ในพื้นที่ได้อย่าง มีประสิทธิภาพต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเกิดโรคห้วเหลืองและชนิดของพาหะของโรคห้วเหลืองในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำในจังหวัดราชบุรี
2. เพื่อศึกษาชนิดของไวรัสห้วเหลืองและการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองชนิดนี้ในพาหะในห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสห้วเหลืองจากพาหะสู่กุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ
4. เพื่อศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมในน้ำที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

## การตรวจเอกสาร

### 1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแปซิฟิกหรือกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งพันธุ์พื้นเมืองของชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกบริเวณอเมริกาใต้และกลาง (Rosenberry, 1997) สามารถพบได้ในทางตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกไปจนกระทั่งถึงทางตอนเหนือของประเทศเปรูที่มีช่วงอุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 องศาเซลเซียสขึ้นไป (Holthuis, 1980) เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว มีต้นทุนในการเลี้ยงต่ำ เป็นกุ้งขนาดเล็กแต่ให้ผลผลิตสูงมาก ทำให้เป็นที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายและมีแนวโน้มว่าจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอีกในอนาคต ในทวีปเอเชียมีการนำเข้าลูกกุ้งชนิดนี้เข้ามาเลี้ยงครั้งแรกที่ประเทศไทยได้หวั่นในปี พ.ศ. 2539 สำหรับประเทศไทยเกษตรกรรมเริ่มนำลูกกุ้งขาวมาเลี้ยงในปี พ.ศ. 2540 แต่เป็นการลักลอบนำเข้าจากประเทศไต้หวัน ประกอบกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 เป็นต้นมาประสบปัญหากุ้งโตช้าและให้ผลผลิตต่ำ จนกระทั่งมีความพยายามจากทางภาคเอกชนเพื่อขออนุญาตนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ กุ้งขาวปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free, SPF) จากต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยง เพื่อเพิ่มผลผลิตทดแทนกุ้งกุลาดำที่กำลังมีปัญหาผลผลิตตกต่ำ ต่อมาในปี พ.ศ. 2545 กรมประมงได้อนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวปลอดเชื้อเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่วันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2545 ถึงวันที่ 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 โดยอนุญาตให้นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวได้จากแหล่งที่กรมประมงรับรองแล้วเท่านั้น (มาลินี และสมยศ, 2548) หลังจากมีการทดลองเลี้ยงกุ้งขาว พบว่าให้ผลผลิตค่อนข้างดี ทำให้เกษตรกรจำนวนมากเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาวกันมากขึ้น และทำให้มีการเลี้ยงกุ้งชนิดนี้เพิ่มมากขึ้นในทุกพื้นที่ (ชลอและพรเลิศ, 2547)

ชลอ และ พรเลิศ (2547) แบ่งรูปแบบการเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศไทย ตามความเค็มของน้ำ ที่เลี้ยงได้เป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มต่ำ เป็นการเลี้ยงในเขตพื้นที่น้ำจืด เช่น พื้นที่ทางภาคกลาง ใช้น้ำความเค็มต่ำมากจนเกือบจะเป็นระดับที่ถือว่าเป็นน้ำจืด โดยใช้น้ำเค็มจากนาเกลือที่มีความเค็ม 100-200 ส่วนในพันส่วน (พีพีที) มาเติมในน้ำจืดเพื่อให้ได้ความเค็มประมาณ 3-4 พีพีที แล้วทำการเลี้ยงในระบบปิด มีการถ่ายน้ำน้อย ส่วนใหญ่จะกั้นคอกก่อน โดยใช้ผ้าพลาสติกพื้นที่ประมาณ 15 ตารางเมตร ความลึกประมาณ 80 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำจากนาเกลือเข้าไปในคอกจนได้ความเค็มประมาณ 8-10 พีพีที หลังจากนั้นจะใช้ลูกกุ้งระยะโพสลาาร์วา 10-12 ที่ปรับความเค็มจากโรงเพาะฟักแล้ว มาปล่อยลงในคอก อนุบาลลูกกุ้งในคอกประมาณ 3-4 วัน จึงเปิดคอก เนื่องจากกุ้งขาวเป็นกุ้งที่กินอาหารเก่งและว่ายน้ำตลอดเวลาอาจจะมีการกินกันเอง

เพราะฉะนั้นจึงไม่นิยมอนุบาลนานเกินไป ส่วนอีกวิธีหนึ่งเกษตรกรจะเตรียมน้ำความเค็มประมาณ 3-5 พีพีที ทั้งบ่อ แล้วให้ทางโรงเพาะฟักปรับความเค็มของลูกกุ้งให้ใกล้เคียงกับความเค็มในบ่อที่จะให้อัตรารอดตายสูงกว่า กล่าวคือถ้าปล่อยลูกกุ้ง 100,000 ตัว จะมีผลผลิตประมาณ 1,000 กิโลกรัม หรือมากกว่า 1,000 กิโลกรัมเล็กน้อย ได้กุ้งขนาด 60-80 ตัวต่อกิโลกรัม ภายในระยะเวลาการเลี้ยง 3 เดือน

แบบที่ 2 การเลี้ยงกุ้งขาวด้วยน้ำความเค็มปกติ ซึ่งเป็นน้ำที่มีความเค็ม 10 พีพีทีขึ้นไปในบริเวณพื้นที่ริมชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะการเลี้ยงทางภาคตะวันออกและภาคใต้ ส่วนมากจะมีการปล่อยลูกกุ้งอย่างหนาแน่นมากกว่า 120,000 ตัวต่อไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 2,000 กิโลกรัมต่อไร่ กุ้งมีอัตราการรอดตายสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตดีกว่าเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ เนื่องจากต้องมีการถ่ายน้ำในปริมาณมากในช่วงท้ายของการเลี้ยง

## 2. คุณภาพน้ำที่สำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้งคือคุณภาพ ของน้ำ ทั้งนี้เพราะ คุณภาพน้ำมีผลต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้ง เนื่องจากปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยระบบพัฒนา มีการปล่อยลูกกุ้งในอัตราความหนาแน่นสูง ทำให้มีการสะสมของเสียที่พื้นบ่อเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ คุณภาพน้ำจะเปลี่ยนไปในทางที่ไม่เหมาะสม กุ้งจะกินอาหารลดลง ในที่สุดกุ้งบางส่วนจะอ่อนแอและติดเชื้อป่วยเป็นโรค ทำให้อัตราการรอดตายลดลง (Boyd and Fast, 1992) คุณสมบัติของน้ำที่มีความสำคัญในการเลี้ยงกุ้งได้แก่

### 2.1 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen, DO)

ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเนื่องจากจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกายเพื่อการเจริญเติบโต รวมทั้งกระบวนการย่อยสลายของเสียโดยแบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจน เช่นกัน แต่ความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจนมีจำกัดและต้องขึ้นกับความดันของบรรยากาศ อุณหภูมิของน้ำและปริมาณเกลือแร่ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำ (Boyd, 1982) โดยในบ่อเลี้ยงกุ้งการละลายของออกซิเจนในน้ำส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องให้อากาศ ในช่วงเวลากลางคืนปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำจะลดลงและมีค่าต่ำสุดตอนเช้ามืด แต่หลังจากมีแสงแดดแพลงก์ตอนพืชเริ่มมีการสังเคราะห์แสง ทำให้ปริมาณออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น จึงมี

ความจำเป็นต้องเปิดเครื่องให้อากาศในตอนกลางคืนเพื่อช่วยในการเพิ่มออกซิเจนให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมและช่วยทำให้อัตราการรอดตายเพิ่มมากขึ้นด้วย (Madenjian, 1990) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีผลต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้ง ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำเกินไปอาจมีผลทำให้กุ้งตายได้ ปริมาณออกซิเจนในน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรมีมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร (พุทธร, 2544) ชลอ และ พรเลิศ (2547) ได้สรุปปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำซึ่งมีผลต่อกุ้งไว้ดังนี้ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมากกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งเจริญเติบโต ได้ดี สารอินทรีย์สลายตัวได้เร็ว ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ 3-4 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งเจริญเติบโตช้าลง การสะสมของสารอินทรีย์เพิ่มขึ้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำน้อยกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งกินอาหารน้อยลง การเจริญเติบโตช้า โอกาสป่วยเพิ่มขึ้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำน้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะขึ้นมาอยู่บริเวณผิวน้ำ กุ้งที่อ่อนแอจะลอกคราบแล้วตายและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กุ้งจะตาย นอกจากนี้ความเค็มและอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจนลดลง

## 2.2 ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ พีเอช (pH)

ความเป็นกรดเป็นด่างหรือพีเอช หมายถึง ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน ( $H^+$ ) ในน้ำ โดยน้ำที่มีความเป็นกลางจะมีพีเอช 7 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 7 แสดงว่าน้ำอยู่ในสภาพเป็นกรด และถ้า น้ำมีพีเอชมากกว่า 7 แสดงว่าอยู่ในสภาพเป็นด่าง (นิคม, 2546) การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในบ่อเลี้ยงกุ้งจะถูกควบคุมโดยปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์และปริมาณไอออนที่มีอยู่ในน้ำ ซึ่งในช่วงกลางวันแพลงก์ตอนพืชจะใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากไบคาร์บอเนตเพื่อการสังเคราะห์แสงทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้น ถ้าแพลงก์ตอนพืชมีปริมาณมากจะทำให้ ค่าพีเอชสูงในตอนบ่าย ส่วนในเวลา กลางคืนคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มมากขึ้นจากกระบวนการหายใจโดยแพลงก์ตอนพืชและ สิ่งมีชีวิตที่อยู่ในบ่อรวมทั้งกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ จึงทำให้พีเอชต่ำในตอนเช้ามืด (ชลอ, 2543) พีเอชของน้ำมีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำตัวอื่น ๆ เช่น เมื่อพีเอชสูงขึ้นความเป็นพิษของ แอมโมเนียจะมากขึ้น หากพีเอชมีค่าที่ต่ำลงจะส่งผลให้ความเป็นพิษของไฮโดรเจนซัลไฟด์เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ พีเอชของน้ำที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 กล่าวคือ ค่าพีเอชที่ต่ำสุดในรอบวันไม่ควรต่ำกว่า 7.5 และค่าพีเอชสูงสุดในรอบวันไม่ควรเกิน 8.5 ซึ่งความแตกต่างของพีเอชในรอบวันไม่ควรมากกว่า 0.5 (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) และจากการศึกษาของ Boyd (1982) พบว่า หากพีเอชของน้ำน้อยกว่า 6 หรือมากกว่า 11 กุ้งจะตาย หากพีเอชอยู่ระหว่าง 6-9 กุ้ง จะมีการเจริญเติบโตดี

### 2.3 ความเป็นด่าง (Alkalinity)

ค่าความเป็นด่างของน้ำ หมายถึง ความสามารถหรือคุณสมบัติของน้ำที่จะรับเอาไฮโดรเจนไอออน ( $H^+$ ) เพื่อที่จะทำให้กรดเป็นกลาง หากพีเอชสูงขึ้นจะทำให้น้ำมีความเป็นด่างมากขึ้น ค่าความเป็นด่างมีความสำคัญกับอัตราการรอดและการเจริญเติบโตของกุ้ง ภายใบบ่อ โดยค่าที่เหมาะสมของความเป็นด่างอยู่ระหว่าง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ , 2547) สอดคล้องกับ (Boyd, 1989) รายงานว่า ความเป็นด่างของน้ำที่เหมาะสมในการเลี้ยงสัตว์น้ำควรรอยู่ในช่วง 100-120 มิลลิกรัมต่อลิตร เพราะโดยปกติในแหล่งน้ำจะประกอบด้วยคาร์บอเนต ( $CO_3^{2-}$ ) ไบคาร์บอเนต ( $HCO_3^-$ ) และไฮดรอกไซด์ ( $OH^-$ ) เป็นส่วนใหญ่ แต่อาจจะมีพวกบอเรต (borates) ซิลิเกต (silicates) ฟอสเฟต (phosphate) และสารอินทรีย์ต่าง ๆ อยู่บ้าง แต่เป็นจำนวนน้อย ค่าพีเอชของน้ำนั้นจะเป็นตัวกำหนดสารประกอบ alkalinity ที่ละลายอยู่ในน้ำ โดยน้ำที่มีพีเอช 7.0-8.3 จะมีไบคาร์บอเนตมาก น้ำที่มีพีเอชตั้งแต่ 8.3 ขึ้นไปจะเริ่มมีคาร์บอเนต น้ำที่มีพีเอช 9.5-10.5 จะมีคาร์บอเนตมาก และน้ำที่มีพีเอช 11 จะมีไฮดรอกไซด์มาก ค่าความเป็นด่างเพียงตัวเดียวไม่ถือว่าเป็นสารมลพิษ แต่จะมีผลเกี่ยวเนื่องกับคุณสมบัติอื่น ๆ เช่น พีเอช ความเป็นกรดและความกระด้าง เป็นต้น (Brawn *et al.*, 1983) ดังนั้นความเป็นด่างของน้ำจึงเป็นค่าแสดงถึงความสามารถของน้ำที่จะป้องกันไม่ให้พีเอชเปลี่ยนแปลง (buffer capacity) (Wedemeyer *et al.*, 1976) ค่าความเป็นด่างในแหล่งน้ำธรรมชาติจะแตกต่างกันออกไป โดยมีค่าตั้งแต่ 25 จนถึง 400-500 มิลลิกรัมต่อลิตร (Boyd, 1982; 1990) ค่าความเป็นด่างมีความสำคัญอย่างมากในการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลทุกชนิด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดตายและเจริญเติบโต ซึ่งค่าความเป็นด่างที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งควรรอยู่ระหว่าง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

### 2.4 ความกระด้าง (Hardness)

ความกระด้างของน้ำส่วนใหญ่มักเกิดจากตะกอนของแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) และแมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{2+}$ ) ในน้ำ ซึ่งสามารถวัดออกมาเป็นปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ( $CaCO_3$ ) ปริมาณความกระด้างรวม หมายถึง ผลรวมของความกระด้างอันเนื่องมาจากผลรวมความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียม ความกระด้างที่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งไม่ควรต่ำกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ศิริเพ็ญ, 2543) ความกระด้างมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นด่างและพีเอช นอกจากนี้ความกระด้างของน้ำยังช่วยลดความเป็นพิษได้เช่นกัน ดังนั้นน้ำกระด้างปานกลางหรือสูงจึงมีความเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง

## 2.5 แอมโมเนีย (Ammonia)

แอมโมเนียในน้ำ เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์น้ำ กระบวนการเน่าสลายของเศษอาหารที่เหลือ แพลงก์ตอนที่ตาย เศษซาก กพีชซากสัตว์และสารอินทรีย์ ยอื่น ๆ โดยจุลินทรีย์ (Boyd, 1982) แอมโมเนียที่พบในน้ำซึ่ง เป็นสารประกอบของไนโตรเจนถูกปล่อยออกมาจากกระบวนการ ammonification พบในรูปของแอมโมเนียมที่แตกตัวเป็นไอออน (ionize ammonia;  $\text{NH}_4^+$ ) ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำต่ำ และแอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นไอออน (unionize ammonia;  $\text{NH}_3$ ) ซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ การวัดแอมโมเนียโดยทั่วไปจึงเป็นการวัดแอมโมเนียทั้งสองรูปนี้ ค่าที่วัดได้จะเรียกว่าค่าแอมโมเนียรวม (total ammonia nitrogen; TAN) ทั้งสองรูปนั้นจะเปลี่ยนรูปกลับไปกลับมา การที่จะอยู่รูปใดนั้นขึ้นอยู่กับค่าพีเอชและอุณหภูมิ ค่าพีเอชจะส่งผลต่อการแตกตัวเป็นแอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นไอออน มากกว่าอุณหภูมิ (Boyd, 1989) ระดับของแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรน้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อค่าของพีเอชสูง ปริมาณแอมโมเนียจะสูงขึ้นด้วยจะส่งผลต่อกุ้งคือ กุ้งขับถ่ายแอมโมเนียได้น้อยลงทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียในเลือดและเนื้อเยื่อทำให้การใช้ออกซิเจนในเนื้อเยื่อสูงขึ้น ส่งผลให้พีเอชของเลือดเพิ่มขึ้นและมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แอมโมเนียจะไปทำลายเหงือกและความสามารถในการขนส่งออกซิเจน ทำให้กุ้งอ่อนแอและเป็นโรคในที่สุด (ชลอ และ พร เลิศ, 2547) ในทางตรงกันข้าม ถ้าพีเอชของน้ำลดลง แอมโมเนียจะอยู่ในรูปของแอมโมเนียมไอออนทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำลดลง

## 2.6 ไนไตรท์ (Nitrite)

ไนไตรท์เป็นสารประกอบที่อยู่ในรูปของไนโตรเจนจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) ของแอมโมเนีย ในสภาพที่มีออกซิเจนแบคทีเรียพวกไนตริไฟอิงแบคทีเรีย (nitrifying bacteria) จะมีการใช้แอมโมเนียในน้ำเป็นอาหาร โดยแอมโมเนียที่ไม่แตกตัวเป็นไอออนหรือแอมโมเนียมที่แตกตัวเป็นไอออนจะถูกออกซิไดซ์เป็นไนไตรท์ หลังจากนั้น ไนไตรท์จะถูกออกซิไดซ์เป็นไนเตรท ในสภาพที่ขาดออกซิเจนแบคทีเรียจะไม่สามารถทำการเปลี่ยนแอมโมเนียให้เป็นไนไตรท์และไนเตรทได้สมบูรณ์ทำให้แอมโมเนียเหลืออยู่ในแหล่งน้ำ เป็นอันตรายต่อกุ้งในบ่อ โดยทั่วไป ไนไตรท์จะเปลี่ยนเป็นไนเตรทอย่างรวดเร็วจึงไม่สะสมอยู่ในแหล่งน้ำ แต่ในบางสภาวะมีอัตราการออกซิไดซ์แอมโมเนียเร็วกว่าการออกซิไดซ์ไนไตรท์ก็จะเกิดการสะสมของไนไตรท์ขึ้นได้ (ชลอ และพรเลิศ, 2547; Boyd, 1982) โดยทั่วไปจะพบไนไตรท์ในบ่อเลี้ยงปริมาณเพียงเล็กน้อย ไม่เป็นอันตรายต่อการเลี้ยงกุ้ง แต่บางครั้ง ในช่วงที่มีการตายของแพลงก์ตอนพืช

พร้อม ๆ กันเป็นจำนวนมากหรือมีของเสียในบ่อจำนวนมากจะพบว่าไนไตรท์สูง โดยปริมาณไนไตรท์ที่สูงประมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำ (Boyd, 1990) ความเป็นพิษของไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำและพีเอชลดลง นอกจากนี้ค่าความเป็นพิษของไนไตรท์จะถูกยับยั้งโดยคลอไรด์ ในน้ำ ดังนั้นในน้ำทะเลซึ่งมีคลอไรด์สูง ความเป็นพิษของสัตว์น้ำจึงค่อนข้างต่ำ (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

## 2.7 ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Hydrogen Sulphide)

ไฮโดรเจนซัลไฟด์เกิดจากของเสียที่สะสมอยู่บริเวณพื้นบ่อเกิดการเน่าสลาย จะพบเห็นบริเวณพื้นบ่อเป็นสีดำ และมีกลิ่นเหม็นคล้ายไข่เน่า เนื่องจากในสภาวะที่ขาดออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิดสามารถเปลี่ยนสารประกอบที่มีกำมะถันเป็นส่วนประกอบ ให้อยู่ในรูปซัลไฟด์ ซึ่งได้แก่ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ( $H_2S$ ) ไฮโดรเจนซัลไฟด์อ็อกไซด์ ( $HS^-$ ) และไบซัลไฟด์อ็อกไซด์ ( $S^{2-}$ ) การเปลี่ยนแปลงนี้ก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้ำตามพีเอชของน้ำ หากพีเอชของน้ำต่ำ ซัลไฟด์จะอยู่ในรูปของไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ หากพีเอชสูงขึ้นจะมีสัดส่วนของไฮโดรซัลไฟด์อ็อกไซด์และไบซัลไฟด์อ็อกไซด์เพิ่มมากขึ้น ความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำก็จะลดลงตามไปด้วย ระดับสูงสุดของไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่ไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งคือ 0.033 มิลลิกรัมต่อลิตร (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

## 2.8 ความเค็ม (Salinity)

ความเค็ม คือ ความเข้มข้นของอิออนทั้งหมดที่ละลายอยู่ในน้ำแสดงในรูปมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) แต่นิยมใช้ในส่วนในพันส่วน (พีพีที) (part per thousand: ppt) อิออนที่อยู่ในน้ำที่เป็นองค์ประกอบในการก่อให้เกิดความเค็มของน้ำมีอยู่ 7 ชนิด ประกอบด้วย โซเดียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม คลอไรด์ ซัลเฟต และไบคาร์บอเนต ความเค็มมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำมากโดยจะมีผลต่อการควบคุมปริมาณน้ำในร่างกาย และควบคุมปริมาณน้ำเข้าออกจากตัวของสัตว์น้ำ (ชลอ และ พรเลิศ , 2547) กุ้งขาวแวนนาไม่สามารรถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มในช่วงกว้าง (Castile *et al.*, 1981) และสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็มตั้งแต่ 0.5-4.0 พีพีที (Smith and Lawrence, 1990; Bray *et al.*, 1994; Samocha *et al.*, 2001) ลูกกุ้งขาวระยะโพสลาาร์วจะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็มประมาณ 20 พีพีที และเมื่อลดความเค็มลงเหลือ 5 พีพีทีหรือเพิ่มความเค็มให้สูงถึง 45 พีพีที การเจริญเติบโตจะลดลง แต่จากการศึกษาพบว่ากุ้งขาวจะเจริญเติบโตได้ดีที่ความเค็ม 33 พีพีที ซึ่งใกล้เคียง กับความเค็มของน้ำทะเล สอดคล้องกับที่

ชลด และ พรเลิศ (2547) ที่รายงานว่า การเลี้ยงกุ้งขาวด้วย น้ำที่มีความเค็มปกติจะให้ผลดีกว่าน้ำ ความเค็มต่ำ

## 2.9 การนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity หรือ EC)

การนำไฟฟ้า คือ ความสามารถในการนำไฟฟ้าของน้ำหรือของเหลวอื่น ซึ่งขึ้นอยู่กับ ปริมาณไอออน mobility valence และ relative concentration ของน้ำหรือของเหลว (สุธี, 2543) ซึ่ง พบว่าสารประกอบอนินทรีย์ เช่น กรดอนินทรีย์ เบสและเกลือ เป็นตัวนำไฟฟ้าได้ดี ตรงข้ามกับ สารอินทรีย์ซึ่งไม่แตกตัวในน้ำ ดังนั้น จึงไม่นำไฟฟ้า ค่าการนำไฟฟ้า ของน้ำไม่ได้บอกให้ทราบถึง ชนิดของสารในน้ำแต่บอกเพียงว่ามีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารในน้ำเท่านั้น (กรรณิการ์, 2522) นอกจากนี้ค่าการนำไฟฟ้าของน้ำจะแปรผันตามอุณหภูมิและพีเอชของน้ำด้วย คือ น้ำที่มีค่าพีเอชสูง กว่า 9 หรือต่ำกว่า 5 จะมีผลต่อการนำไฟฟ้ามากและถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นสารต่าง ๆ จะแตกตัวได้ดี ทำ ให้ค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้น จากการที่การนำ ไฟฟ้ามีความสัมพันธ์ กับปริมาณไอออนชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำทะเล ทำให้สามารถนำค่าการนำ ไฟฟ้านี้มาใช้ในการศึกษาหาขอบเขต การแพร่กระจายความเค็มจากบ่อเลี้ยงกุ้งสู่บริเวณข้างเคียงได้ (ประวิทย์ และ พิภพ, 2539)

## 2.10 ความโปร่งแสง (Transparency)

ความโปร่งแสง คือ ค่าความลึกที่สามารถมองเห็นวัตถุแผ่นกลม (Secchi disc) ที่หย่อน ลงในน้ำจนถึงระดับความลึกที่มองไม่เห็นวัตถุดังกล่าว (ศิริเพ็ญ, 2543) เป็นดัชนีที่บ่ง บอกถึง ปริมาณแพลงก์ตอนพืชและตะกอนแขวนลอยในบ่อเลี้ยงกุ้ง หากน้ำมีความขุ่นมากแสงส่องลงได้ น้อยจะอ่านค่าความโปร่งแสงได้น้อย ในทางกลับกันแหล่งน้ำจืดที่ขาดความสมบูรณ์ มีอาหาร ธรรมชาติน้อย จะมีค่าความโปร่งแสงมาก ซึ่งค่าความโปร่งแสงที่เหมาะสมสำหรับบ่อเลี้ยงกุ้งควร อยู่ระหว่าง 25-50 เซนติเมตร (Brock and Main, 1994)

## 2.11 อุณหภูมิของน้ำ (Water Temperature)

อุณหภูมิของน้ำเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการแพร่พันธุ์ ของพืชและ สัตว์ ซึ่งอุณหภูมิของน้ำตามธรรมชาติจะผันแปรตามอุณหภูมิอากาศโดยขึ้นกับฤดูกาล ระดับความ สูง กระแสลม ความลึก ความเร็วของกระแสน้ำและสภาพแวดล้อมทั่วไปของแหล่งน้ำ นอกจากนี้

ยังเป็นปัจจัยที่ควบคุมปฏิกริยาเคมีในน้ำ รวมทั้งควบคุมอัตราการสังเคราะห์แสง อัตราการหายใจ อัตราการย่อยสลายและมีอิทธิพลโดยตรงต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (ศิริเพ็ญ, 2543) เมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้น จะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้นเพราะเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นจะทำให้การแตกตัวเป็นไอออนของเกลือมากขึ้น (สุธี, 2543) ปริมาณออกซิเจนจะละลายลดลง และยังมีผลทำให้สารพิษประเภทต่าง ๆ เช่น ยากำจัดศัตรูพืช และโลหะหนักมีความรุนแรงมากขึ้น อีกทั้งยังช่วยเร่งให้มีการดูดซึมและการแพร่กระจายของสารพิษเข้าสู่ร่างกายได้เร็ว และจะทำให้แอมโมเนียในรูปที่เป็นพิษ (un-ionized ammonia) แตกตัวเพิ่มมากขึ้น (Boyd, 1982) อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งขาวอยู่ระหว่าง 26-33 องศาเซลเซียส (Wickins and Lee, 2002)

### 3. โรคหัวเหลือง (Yellow - head disease; YHD)

โรคหัวเหลืองมีรายงานการระบาดครั้งแรกในฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยที่มีการเลี้ยงแบบพัฒนา (Limsuwan, 1991) และต่อมาได้มีการระบาดในกุ้งที่เพาะเลี้ยงในเอเชีย (Albaladejo *et al.*, 1998; Boonyaratpalin *et al.*, 1993; Chantanachookin *et al.*, 1993; Mohan *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานจากกุ้งที่เลี้ยงในแถบอเมริกา (Lightner *et al.*, 1997; Loh *et al.*, 1998) ซึ่งในระหว่างปี พ.ศ. 2535-2536 การแพร่ระบาดของไวรัส YHV ได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกว่า 40 ล้านเหรียญ (Flegel *et al.*, 1997)

เชื้อไวรัส YHV เป็น RNA ไวรัสสายเดี่ยว (ssRNA) (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) อยู่ในสกุล Okavirus วงศ์ Roniviridae อันดับ Nidovirales (Cowley *et al.*, 1999; Mayo, 2002) พบมีอย่างน้อย 6 สายพันธุ์ (genotype) (Walker *et al.*, 2001) ตัวอย่างเช่น เชื้อ YHV ที่มีรายงานในประเทศไทย มีความแตกต่างของลำดับสารพันธุกรรมกับเชื้อไวรัส gill-associated virus (GAV) จากออสเตรเลีย ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (Cowley *et al.*, 1999) รวมทั้งแตกต่างจากสายพันธุ์ใหม่ที่ พบในประเทศไทยและเวียดนาม ไวรัสเหล่านี้ถูกจัดรวมอยู่ในกลุ่มของ YHV-complex (Walker *et al.*, 2001) แต่สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงคือ YHV-1 และการศึกษาส่วนใหญ่จะเน้นให้ความสำคัญกับ YHV-1 เนื่องจากก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งกุลาดำอย่างมาก (Anantasomboon *et al.*, 2008) ข้อมูลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ของเนื้อเยื่อ ectoderm และ mesoderm ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ YHV เป็นไวรัสในกลุ่ม Baciliform ที่มีผนังหุ้ม มีขนาดความยาวตั้งแต่ 150 ถึง 200 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 40 – 50 นาโนเมตร และพบอยู่ภายใน vesicle ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อและในช่องว่างระหว่างเซลล์

(Boonyaratpalin *et al.*, 1993; Chantanachookin *et al.*, 1993; Nadala *et al.*, 1997b) อนุภาคไวรัสพัฒนามาจาก nucleocapsid ที่ค่อนข้างยาวและมี filament (ขนาดประมาณ 15 x 130-800 นาโนเมตร) ซึ่งรวมกลุ่มกันภายในไซโทพลาสซึมและสร้างผนังหุ้ม (envelope) บริเวณ endoplasmic reticulum เข้าไปสู่ส่วน vesicle ภายในเซลล์ จากการข้อมล พบว่าอนุภาคของ YHV มี spike สั้น ๆ อยู่บนส่วนของผนังหุ้ม YHV สามารถก่อให้เกิดการตายของกุ้งในกลุ่ม penaeid ที่เพาะเลี้ยงหลายชนิด มีการรายงานเชื้อไวรัสชนิดหนึ่งในประเทศออสเตรเลียซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ YHV คือ gill associated virus (GAV) พบครั้งแรกในกุ้ง *P. monodon* ที่ใกล้ตายระหว่างที่มีการระบาดของโรค Yellowhead-like disease (Spann *et al.*, 1998) แต่ก่อนหน้านี้ได้เคยมีรายงานพบในกุ้ง *P. monodon* ปกติในออสเตรเลียมาก่อน โดยใช้ชื่อ lymphoid organ virus (LOV) พบว่ารายงานเหล่านี้เป็นการค้นพบไวรัสชนิดเดียวกัน แต่ในระดับของการติดเชื้อต่าง ๆ กัน คือ ระดับเรื้อรัง (chronic) ระยะเวลาไม่แสดงอาการ และระดับเฉียบพลัน การติดเชื้อ GAV แบบเรื้อรังมักพบในกุ้ง *P. monodon* ปกติในธรรมชาติทางภาคตะวันออกของออสเตรเลีย (Walker *et al.*, 2001) และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกระหว่างการวางไข่ได้ (Cowley *et al.*, 2002) การติดเชื้อ GAV แบบเฉียบพลันจะก่อให้เกิดอัตราการตายสูง แต่ลักษณะอาการและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ อาจจะแตกต่างไปจากการติดเชื้อ YHV (Spann *et al.*, 1998) การเปรียบเทียบลำดับของ DNA จากการทำ reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ระหว่าง YHV และ GAV พบว่าเป็นสายพันธุ์ไวรัสที่ใกล้เคียงกันมาก (Cowley *et al.*, 1999; Sittidilokratna *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2001) ส่วนเชื้อ YHV สายพันธุ์ที่สาม มักจะพบในกุ้ง *P. monodon* ปกติในประเทศไทยและเวียดนาม แต่ไวรัสชนิดนี้ไม่ได้ถูกแยกมาจากกุ้งที่แสดงอาการของ โรคหัวเหลืองไวรัสสายพันธุ์ที่สามนี้มีลำดับของสารพันธุกรรมคล้ายคลึงกับ GAV มากกว่า YHV ส่วนเชื้อ YHV สายพันธุ์ที่สี่ มีรายงานจากประเทศไทย (Sang-oum *et al.*, 2003) โดยแยกได้จากกุ้งที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า จากการตรวจสอบลำดับของสารพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์นี้ พบว่าแตกต่างจาก YHV และ GAV ประมาณ 20 เบสคู่เบส และยังคงไม่มีข้อมูลว่าไวรัสชนิดนี้เป็นสาเหตุของการโตช้าของกุ้งหรือไม่ สายพันธุ์ที่ห้าและหกพบในกุ้ง *P. monodon* ปกติจากประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และ ประเทศ โมแซมบิก ตามลำดับ (Chayaburakul *et al.*, 2004; Cowley *et al.*, 2004b) ในบัญชีรายชื่อโรคของ OIE ทั้ง GAV และไวรัสที่คล้ายคลึงกัน ได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ YHV โดยสรุปพบว่า YHV complex virus ประกอบด้วยอย่างน้อย 6 สายพันธุ์ จากการพิสูจน์ยืนยันด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของกุ้งพื้นเมืองของออสเตรเลีย ไทย และเวียดนาม และสายพันธุ์อื่น ๆ จากฟิลิปปินส์ อินเดีย และแถบอเมริกา

### 3.1 ลักษณะอาการของโรคและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

โรคหัวเหลืองเรียกชื่อตามลักษณะของกุ้งป่วยซึ่งมักอยู่ตามริมขอบบ่อ ลำตัวสีซีด มองเห็นส่วนหัวมีสีเหลือง(Boonyaratpalin *et al.*, 1993; Chantanachookin *et al.*, 1993; Limsuwan, 1991) ในกุ้งทะเลกลุ่มpenaeid ที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลืองจะมีอายุตั้งแต่ 25 วันขึ้นไปจนถึงประมาณ 70 วัน โดยถ้าเกิดกับกุ้งกุลาดำอายุ 5-30 วัน จะมีลักษณะคล้ายกับโรคตายเดือนหรือโรคติดเชื้อแบคทีเรีย แต่จะมีความรุนแรงมากกว่า และถ้าเกิดกับกุ้งอายุประมาณ 50-70 วัน ก่อนที่จะเริ่มมีกุ้งตายพบว่ากุ้งในบ่อจะกินอาหารในปริมาณมากก่อนที่จะหยุดกินอาหารและเริ่มมีการตายจนกระทั่งหมดบ่อ โดยอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2-3 วัน กุ้งจะตายหมดบ่อและเมื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรคที่ทำความเสียหายใน การเลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกชนิดพบว่าโรคหัวเหลืองทำให้กุ้งตายเร็วและรุนแรงที่สุด ซึ่งการแพร่กระจายในพื้นที่การเลี้ยง แต่ละแหล่งจะรวดเร็วมาก (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) และจากรายงานของ พรเทพ (2537) พบว่ากุ้งบางส่วนที่เป็นโรคอาจไม่ได้แสดงอาการหัวเหลือง แต่เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบว่ามีลักษณะเหมือนกับตัวอย่างกุ้งที่เป็นโรคหัวเหลือง

อย่างไรก็ตามพบว่าการตายของกุ้งที่เกิดจาก เชื้อดังกล่าวเริ่มลดลงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 เนื่องจากมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้ง จากระบบเปิดมาเป็นระบบปิดถ่ายน้ำน้อยลงหรือใช้ระบบปิดแบบน้ำหมุนเวียนแต่การแพร่ระบาดของไวรัสยังคงมีอยู่และก่อให้เกิดความเสียหายกับการเลี้ยงกุ้งในเอเชีย (Lightner *et al.*, 1997) จากการศึกษาโรคในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำของปิยนุช (2550) พบว่าลักษณะอาการภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ YHV ลำตัวของกุ้งมีสีซีด ส่วน หัวมีสีเหลือง เนื่องจากบริเวณตับและตับอ่อนมีสีซีดเหลืองต่างจากกุ้งปกติที่จะมีตับและตับอ่อนสีน้ำตาล ลำตัวมีสีซีดกว่าปกติ และเมื่อยืนยันผลด้วยชุดทดสอบimmunogold test strip YHV/GAV พบว่าให้ผลเป็นบวก ในขณะที่กุ้งบางส่วนที่ส่วนหัวมีสีปกติให้ผลเป็นลบ

พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง มีการตายของเซลล์ (necrosis) กระจายอยู่ทั่วไป เช่น มีการ ตายของเซลล์โดยนิวเคลียสหดตัวเล็กลง และโครมาตินจะรวมตัวเป็นก้อน (nucleus pyknosis) หรือเกิดการแยกออกเป็นชิ้น ๆ ของนิวเคลียสกระจายอยู่ทั่วไปในไซโทพลาสซึม (karyorrhexis) อย่างเด่นชัด บริเวณเหงือก และต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) พบ basophilic cytoplasmic inclusion ติดสีน้ำเงินจากการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) (Chantanachookin *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1994; ปิยนุช, 2550) ที่เหงือกพบว่า เซลล์เยื่อ (pillar cell) และ

เม็ดเลือดเกิดการตาย ซึ่งจะแสดงลักษณะ pyknosis และ karyorrhexis และจากรายงานของลีทิจและคณะ (2535) พบว่ามีการบวมน้ำ และมีการขยายตัวของแองเงอเลือดทำให้ซีพียอมีการขยายแผ่ซิดติดกัน มีการตายอย่างรุนแรง คือ แสดงลักษณะ pyknosis และ karyorrhexis ของเซลล์ดังกล่าว (ชลอและคณะ, 2536)

นอกจากนี้ยังเกิดลักษณะช่องว่างในเซลล์ และลักษณะก้อนกลม ๆ ติดสีเข้มที่บออยู่ภายในไซโตพลาสซึมคล้ายกับอินคลูชันบอดี ซึ่งเรียกลักษณะดังกล่าวว่า spherical basophilic cytoplasmic inclusion, basophilic body หรือ dense body (Flegel and Sriurairatana, 1993; ลีทิจและคณะ, 2535) ซึ่งเกิดขึ้นทั้งเซลล์ของ วัชวะต่อมน้ำเหลือง และเซลล์ของเม็ดเลือด ลักษณะ nuclear hypertrophy และ chromatin margination และการสร้างส่วนประกอบต่าง ๆ ของไวรัส (virogenic stroma) ทำให้บริเวณนิวเคลียสใสว่างเปล่า (eclipse phase activity) และเมื่อศึกษาพยาธิสภาพของต่อมน้ำเหลือง พบการเกิด spheroid (ปิยนุช, 2550) นอกจากนี้ยังพบว่าการตายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่าง ๆ ได้เช่นผิวหนังมีส กล้ามเนื้อลาย กล้ามเนื้อหัวใจ ผนังหรือเยื่อกระดูกอาหาร และทางเดินอาหารส่วนกลาง และในอาร์เซลล์ (R - cell) ของตับและตับอ่อนมีการสะสมไขมันระดับปานกลางจนถึงมาก นอกจากจะเกิดลักษณะดังกล่าวข้างต้นแล้ว ชลอและคณะ (2536) พบว่าถุงปวยที่บริเวณขอบบ่อจากบ่อเลี้ยงกึ่งที่ปวยเป็น โรคหัวเหลือง ยังเกิดลักษณะ encapsulation ของเม็ดเลือดในบริเวณแองเงอเลือด ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของเม็ดเลือด เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม และเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการติดเชื้อในลักษณะที่เป็น secondary infection

เนื้อเยื่อบริเวณผนังกระดูกอาหารมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีการตายของเซลล์เยื่อผนังกระดูกอาหารและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Nash *et al.*, 1993) เนื้อเยื่อที่แทรกอยู่ระหว่างท่อ ตับและตับอ่อนจะพบว่ามีการตายโดยเกิดลักษณะ necrosis

ลักษณะทางพยาธิสภาพที่เกิดในอวัยวะสร้างเม็ดเลือดจะพบว่าการตายของเนื้อเยื่อ (Nash *et al.*, 1993) เซลล์ของเม็ดเลือดมีการตาย คือ แสดงลักษณะ pyknosis และ karyorrhexis บางเซลล์มีขนาดใหญ่ ซึ่งผิดปกติ บางเซลล์มีอินคลูชันบอดี (inclusion body) และปริมาณเม็ดเลือดแดงของกึ่งจะลดลงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเม็ดเลือดจากกึ่งปกติ

### 3.2 การแพร่กระจายและการระบาด

เชื้อ YHV สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ที่กำเนิดจากชั้น ectoderm และ mesoderm ได้ และไวรัสสามารถอยู่ในน้ำและติดต่อกันไปยังเจ้าบ้านอื่น ๆ ได้ (horizontal transmission) (Flegel *et al.*, 1995) นอกจากนี้การติดต่อแบบ horizontal transmission อาจเกิดจากการกินกุ้งที่ใกล้ตายหรือตายแล้ว และการกินพาหะที่ติดเชื้อเข้าไป (Flegel *et al.*, 1995) น้ำจากแหล่งที่มีการระบาดของโรคสามารถที่จะก่อให้เกิดการติดเชื้อได้เป็นระยะเวลา 4 วัน (Flegel *et al.*, 1995) จากข้อมูลพบว่า YHV สามารถถูกถ่ายทอดผ่านรังไข่ที่ติดเชื้อ รวมทั้ง spermatophore ได้ (vertical transmission) (Cowley *et al.*, 2002) และจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า เชื้อไวรัสชนิดนี้จะอยู่ในน้ำทะเลโดยปราศจากตัวโฮสต์ (host) ได้เป็นระยะเวลาไม่ต่ำกว่า 12 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง และเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองสามารถที่จะอยู่ได้ทุกระดับความเค็ม คือ 10, 20 และ 30 พิพีที (พรเทพ, 2537)

มีรายงานการติดเชื้อ YHV ของกุ้งในธรรมชาติได้แก่ *P. monodon*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *Metapenaeus ensis*, *Palaemon styliferus* และ *Euphasia superba* (Flegel, 1997) ผลจากการทดลองพบว่า YHV ยังสามารถก่อให้เกิดอัตราการตายสูงในกุ้งกลุ่ม penaeid อื่น ๆ ได้แก่ *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. aztecus* และ *P. duorarum* (Lightner *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1994, 1997) และในกุ้งกลุ่ม palaemonid มีการยอมรับการติดเชื้อ YHV คือ *Macrobrachium sintangense*, *P. styliferus* และ *P. serrifer* รวมทั้ง *P. pugio* มีการยอมรับการติดเชื้อ YHV (Ma. *et al.*, 2009) แต่ในกุ้ง *M. rosenbergii* และ *M. lanchesteri* มีด้านทานการต่อโรค YHV (Longyant *et al.*, 2005) เชื้อ GAV มีรายงานเฉพาะในกุ้ง *P. monodon* ในออสเตรเลีย ซึ่งเป็นกุ้งเพียงชนิดเดียวที่พบการติดเชื้อชนิดนี้ (Owens, 1997; Spann *et al.*, 1998; Spann *et al.*, 1995; Walker and Cowley ,2000) นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อ GAV และการตายของกุ้ง *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguensis* และ *P. vannamei* จากการทดลอง (Spann *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2002) เชื้อ YHV สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในกุ้งที่เพาะเลี้ยงได้ตั้งแต่ช่วงปลายของระยะโพสลาร์วาเป็นต้นไป แต่ในประเทศไทยอัตราการตายสูงมักจะพบในกุ้งระยะ juvenile และยังพบว่า มีสัตว์น้ำกลุ่ม crustacean หลายชนิดที่เป็นพาหะของ YHV (Flegel, 1997) กุ้งในกลุ่ม *M. affinis* ที่ได้รับการฉีดเชื้อ YHV ตายภายใน 10 วัน แต่ *M. brevicornis* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ 30 วันหลังจากฉีดเชื้อ แต่ในกลุ่มปูไม่มีการติดเชื้อ YHV (Longyant *et al.*, 2006) กุ้งในระยะวัยอ่อนจะ

ทนทานต่อการติดเชื้อ ในขณะที่กุ้งระยะ โปสลาร์วา 15 ขึ้นไปจะติดเชื้อได้ง่าย (Kongpradit *et al.*, 1995)

ความรุนแรงของเชื้อ YHV ต่อกุ้งขาวแวนนาไม ที่แยกได้ในช่วงแรก ๆ ของการระบาด ก่อให้เกิดอัตราการตายสูง สำหรับการทดลองกับกุ้งขาวแวนนาไม ในห้องปฏิบัติการ (Lu *et al.*, 1994, 1997) แต่จากการทดลองในกุ้ง *P. esculentis* และ *P. japonicus* พบว่าความรุนแรงของเชื้อนี้ จะมีความสัมพันธ์กับชนิดและช่วงชีวิตของกุ้ง (Spann *et al.*, 2000) นอกจากนี้ Anantasomboon *et al.* (2008) ได้ทำการสกัดเชื้อ YHV จากกุ้งกุลาดำที่เป็นโรคหัวเหลืองแล้วฉีดเชื้อในกุ้งขาวแวนนาไม พบว่ากุ้งไม่แสดงอาการของโรค แต่ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (RT-PCR)

### 3.3 การตรวจโรค Yellow Head Disease (YHD)

การตรวจโรคหัวเหลืองตามวิธีของ OIE (2010) ใช้เทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ซึ่งมีทั้งหมด 3 วิธี

3.3.1 One step RT-PCR คัดแปลงจาก Wongteerasupaya *et al.* (1997) วิธีนี้ใช้ในการยืนยันเฉพาะเชื้อ YHV ในกุ้งป่วย ไม่สามารถใช้ตรวจเชื้อ GAV หรือจีโนไทป์อื่นได้

3.3.2 Multiplex nested PCR คัดแปลงจาก Cowley *et al.* (2004) ใช้ตรวจแยกเชื้อไวรัสได้ ทั้ง YHV และ GAV ในกุ้งป่วย หรือกุ้งที่มีเชื้อแต่ไม่ปรากฏอาการ (healthy carrier) แต่วิธีนี้ไม่สามารถตรวจเชื้อในกลุ่มไวรัสหัวเหลือง (yellow head complex) ได้ทุกจีโนไทป์ที่ปรากฏว่ามีรายงาน (known genotype) และการตรวจวิธีนี้จีโนไทป์ 3 อาจให้ผลเป็น GAV

3.3.3 Multiplex RT-nested PCR โดย Wijegoonawardane *et al.* (2008) ใช้ตรวจหาเชื้อกลุ่มไวรัสหัวเหลืองในกุ้งปกติ (healthy shrimp) ได้ทั้ง 6 จีโนไทป์ที่ปรากฏรายงานการพบรวมทั้ง YHV และ GAV แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้ หากต้องการทราบจีโนไทป์ จะต้องนำผลผลิตจาก RT-PCR ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส (nucleotide sequence analysis) ในขั้นตอนต่อไป

อย่างไรก็ดี ยังไม่ปรากฏรายงานของเชื้อ GAV ในประเทศไทย ดังนั้นการตรวจเชื้อ YHV สามารถใช้เทคนิคที่ดัดแปลงจาก Wongteerasupaya *et al.* (1997) ได้ นอกจากนี้ผู้ตรวจสามารถใช้ชุดทดสอบ (test kit) ที่ผ่านการตรวจสอบและการรับรองโดย OIE ซึ่งสามารถตรวจสอบรายชื่อของชุดทดสอบดังกล่าวได้จากเว็บไซต์ของ OIE สำหรับรายละเอียดของการตรวจเชื้อ YHV ในที่นี้จะสรุปเฉพาะเทคนิคของ Wongteerasupaya *et al.* (1997) และ Cowley *et al.* (2004) ซึ่งเพียงพอสำหรับการตรวจโรคนี้ในประเทศไทย



ตารางที่ 1 สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนหลายชนิดที่สามารถติดเชื้อ YHV

กลุ่ม	ชนิด	การติดเชื้อ		วิธีการตรวจ
		ธรรมชาติ	ทดลอง	
กุ้งกลุ่ม	<i>Penaeus monodon</i>	X	X	RT-PCR, IHC
Peneaid	<i>Penaeus esculentus</i>	X	X	ISH
	<i>Penaeus japonicus</i>	X	X	TEM
	<i>Penaeus merguensis</i>	X	X	ISH, histopathology
	<i>Penaeus vannamei</i>	X	X	histopathology
	<i>Penaeus stylirostris</i>	X	X	TEM, histopathology
	<i>Penaeus setiferus</i>	X	X	histopathology
	<i>Penaeus aztecus</i>		X	histopathology
	<i>Penaeus duorarum</i>		X	histopathology
	<i>Metapenaeus ensis</i>		X	histopathology
	<i>Metapenaeus bennettiae</i>		X	RT-PCR, histopathology
	<i>Metapenaeus brevicornis</i>		X	RT-PCR, IHC
	<i>Metapenaeus affinis</i>		X	RT-PCR, IHC
	<i>Macrobrachium lanchesteri</i>		X	RT-PCR, IHC
	<i>Macrobrachium sintangense</i>	X		RT-PCR, IHC
	<i>Palaemon atyliferus</i>	X	X	RT-PCR, IHC
<i>Palaemon serrifer</i>	X		RT-PCR, IHC	
<i>Acetes sp.</i>		X	RT-PCR, histopathology	

หมายเหตุ: reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemistry (IHC) , *in situ* hybridization (ISH)

ที่มา: Boonyaratpalin *et al.* (1993); Chantanachookin *et al.* (1993); Flegel *et al.* (1995a,b); Lightner *et al.* (1998); Longyant *et al.* (2005); Longyant *et al.* (2006); Lu *et al.* (1994); Munro and Owens (2007); Pantoja and Lightner (2003); Sithigorngul *et al.* (2000); Spann *et al.* (2000); Tang and Lightner (1999); Walker *et al.* (2001); Wang *et al.* (1996)

#### 4. สายพันธุ์ของไวรัสหัวเหลือง

ปัจจุบันได้มีการจำแนกไวรัสหัวเหลืองออกได้เป็น 6 สายพันธุ์ ได้แก่

4.1 สายพันธุ์ที่ 1 พบในกุ้ง juvenile จากการระบาด YHD ในประเทศไทย (THA-00-D11) และประเทศไต้หวัน (TWN-00-D1, TWN-00-D2, TWN-00-D3)

4.2 สายพันธุ์ที่ 2 คือ สายพันธุ์ GAV (Gill Associated Virus) พบครั้งแรกในกุ้งจากประเทศออสเตรเลีย

4.3 สายพันธุ์ที่ 3 พบระบาดในกุ้งระยะโพสลาร์วา จากประเทศไทย และ เวียดนาม

4.4 สายพันธุ์ที่ 4 ตรวจพบในโรงเพาะฟักในประเทศอินเดีย

4.5 สายพันธุ์ที่ 5 พบจากประเทศมาเลเซีย (MYS-03-H4), ประเทศไทย (THA-03-SG21) และฟิลิปปินส์ (PHL-03-H8)

4.6 สายพันธุ์ที่ 6 พบในกุ้งจากประเทศ โมซัมบิก (Wijegoonawardane *et al.*, 2008)

ในปัจจุบันพบว่าไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ที่ 1 ที่พบระบาดในพื้นที่เลี้ยงกุ้งในประเทศไทยนั้นสามารถแยกออกได้เป็น 2 สายพันธุ์คือ YHV1-a ซึ่งพบระบาดในการเลี้ยงกุ้งกุลาคำเดิมและ YHV1-b ซึ่งพบระบาดในพื้นที่ ๆ เลี้ยงกุ้ง ขาวแวนนาไม ด้วยน้ำความเค็มต่ำ ในจังหวัด นครปฐม และจังหวัดราชบุรี ( Sittidilokratana *et al.*, 2009; Senapin *et al.*, 2010)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การศึกษาการเกิดโรคหัวเหลือง (Yellow-head Disease; YHD) และชนิดของพาหะในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำ

เก็บตัวอย่างและติดตามข้อมูล การเกิดโรคไวรัสหัวเหลืองในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง ต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณที่มีการระบาดของโรคในพื้นที่จังหวัดราชบุรี รวมทั้งสิ้น 29 ฟาร์ม ๆ ละ 60 ตัวอย่าง โดยตลอดระยะเวลาการศึกษา ตั้งแต่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2552 ถึง มกราคม พ.ศ. 2554 จะเก็บตัวอย่างกุ้งที่มีอาการป่วยที่ สังเกตได้หรือมีอาการผิดปกติ เช่น ลำตัวของกุ้งมีสีซีด ส่วน หัวมีสีเหลืองเนื่องจากบริเวณตับและตับอ่อนมีสีซีดเหลือง หรืออาจไม่ได้แสดงอาการของโรคหัวเหลือง แต่พบกุ้งป่วยจะลอยบริเวณผิวน้ำ ไม่มีแรงติดตัวพร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดต่าง ๆ ของบ่อเลี้ยงและสภาพการเลี้ยงทั่วไปเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนที่จะเก็บตัวอย่างกุ้งป่วย ที่ยังมีชีวิต ใส่กล่องโฟมที่มีเครื่องให้อากาศพอเพียง พร้อมกับรวบรวมพาหะหรือตัวอย่างสิ่งมีชีวิตสัตว์น้ำที่พบใน ธรรมชาติรอบบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้ง เช่น กุ้งและปูชนิดต่าง ๆ บันทึกอาการ ของตัวอย่างสัตว์น้ำที่ รวบรวมได้ รวมทั้งตัวอย่างกุ้งก้ามกรามจากฟาร์มเลี้ยงที่อยู่ในบริเวณที่มีการระบาดของโรคจากนั้น ถ้าเลี้ยงไป ยัง ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัย ธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิ ทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยที่ตัวอย่างกุ้งป่วยและพาหะส่วนหนึ่ง จะนำไปตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในขณะที่ตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งจะ เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการ สกัดและจำแนกชนิดไวรัสหัวเหลืองต่อไป สำหรับ สัตว์น้ำอื่น ๆ ซึ่งอาจจะเป็นพาหะของโรคจะถูก นำไปเลี้ยงต่อใน ห้องปฏิบัติการ โดยปรับเตรียมคุณภาพน้ำต่าง ๆ ให้ใกล้เคียงกับที่ฟาร์มเลี้ยง จากนั้นนำมาศึกษาตามวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

#### 1.1 การศึกษาการติดเชื้อYHV โดยใช้เทคนิคreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

##### การสกัด total RNA

ตัดเหงือกและรยางค์ว่ายน้ำคู่ที่ 2 ของกุ้งป่วยและกล้ามเนื้อของสัตว์พาหะที่ยังมีชีวิตอยู่มา ศึกษาหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำตัวอย่างกุ้งและพาหะที่รวบรวมได้

จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งในจังหวัดราชบุรี จำนวน 29 ฟาร์ม โดยเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำฟาร์มละ 60 ตัวอย่างมาสกัด RNA ด้วย TRI-reagent มีขั้นตอน ดังนี้

1. นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด แล้วนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.5 กรัม นำใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี Tri-reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
2. บดตัวอย่างให้ละเอียดใน Tri-reagent 500 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. เติม BCP (basal core promoter) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่หลอดตัวอย่างแล้วทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
4. นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5. ใช้ปิเปตดูดส่วนใสจากกันหลอด มาใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม Iso-propanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด ทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
6. นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
7. ได้ตะกอนสีขาวของ RNA จะตกที่ก้นหลอด เทเอาสารละลายส่วนใสด้านบนออก หลังจากนั้นเติมแอลกอฮอล์ความเข้มข้นที่ 75 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในหลอด
8. นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 7,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
9. เทสารละลายส่วนใสด้านบนออก กว่าหลอด ทิ้งหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-20 นาทีเพื่อให้สารละลายที่เหลือระเหยหมด

10. ละลายตะกอน RNA ด้วย DEPC (diethylpyrocarbonate) ddH<sub>2</sub>O ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปใช้ในขั้นตอน RT-PCR ต่อไป หรือเก็บตัวอย่าง RNA ที่สกัดไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

#### Nested RT-PCR

นำตัวอย่าง RNA ที่ได้มาตรวจเชื้อไวรัสในการ amplify รอบแรกด้วยวิธี one step RT-PCR โดยใช้ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง รายละเอียดของลำดับเบสในไพรเมอร์ และปริมาณของสารที่ใช้ในการเตรียม PCR master mix แสดงไว้ในตารางที่ 1 สำหรับโปรแกรมของ RT-PCR ที่ใช้ในการ amplify มีดังนี้

1. Reverse transcription ที่ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที
2. Pre-denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที
3. Amplification (จำนวน 35 รอบ)
  - denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที
  - annealing ที่ 50 °C เป็นเวลา 45 วินาที
  - extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที
4. Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

ตารางที่ 2 รายละเอียดของไพรเมอร์และปริมาณของส่วนประกอบใน RT-PCR

PCR master mix	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
2X Reaction mix	12.5
10 µM F: 5'CTATCAACGTGCAACAACACAA 3'	1
10 µM R: 5' GTGTGGATGCATAAATTCAT 3'	1
SuperScript™ III with Platinum Taq	1
RNase free water	8.5
RNA	1

ตรวจสอบ PCR product ด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis และอ่านผลภายใต้เครื่อง UV โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp พร้อมทั้งบันทึกภาพ PCR product ที่พบว่ามีการติดเชื้อไวรัส YHV จะถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น (template) เพื่อตรวจสอบด้วยการ amplify รอบที่สองว่าเชื้อที่ก่อโรครครั้งนี้เป็น isolation ใหม่ของไวรัส YHV โดยมีรายละเอียดของไพรเมอร์ และปริมาณของสารที่ใช้ใน master mix แสดงในตารางที่ 2 สำหรับรายละเอียดของโปรแกรม PCR มีดังนี้

1. Pre-denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที
2. Amplification (จำนวน 30 รอบ)
  - denaturation ที่ 94 °C เป็นเวลา 45 วินาที
  - annealing ที่ 55 °C เป็นเวลา 45 วินาที
  - extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที
3. Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

**ตารางที่ 3** รายละเอียดของไพรเมอร์และปริมาณของส่วนประกอบใน PCR รอบที่สอง

PCR master mix	ปริมาณ (ไมโครลิตร)/1X
10 X buffer	2
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.6
10 μM dNTP	2
10 μM forward primer, F: 5' CCTATCGCTARATCYTTCAT 3'	1
10 μM reverse primer, R: 5' GTATTTRATRGCKTGTGT 3'	1
DNA Taq polymerase	0.4
water	12.5
DNA	0.5

ตรวจสอบ PCR product ด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp และอ่านผลภายใต้เครื่อง UV พร้อมทั้งบันทึกภาพ PCR product

## 2. การจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมโดยการโคลนยีน

### 2.1 การโคลนยีน

1. นำ PCR product ligate เข้า vector (pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup>, Invitrogen) โดยผสมสารละลาย ตามอัตราส่วน ดังนี้ PCR product (4 ไมโครลิตร), Salt solution (1 ไมโครลิตร), vector (1 ไมโครลิตร) และเติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 6 ไมโครลิตร

2. นำหลอดไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง (22-23 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

3. นำหลอดวางบนน้ำแข็ง คูดสารละลายจากหลอด ปริมาตร 2 ไมโครลิตรใส่ในหลอด competent cell (One Shot<sup>®</sup> TOP 10 Competent *E.coli* Invitrogen)

4. วางหลอดบนน้ำแข็งนาน 30 นาที

5. หลังจากนั้นนำหลอดไปแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำมาวางบนน้ำแข็ง

6. เติม S.O.C. medium ลงไปในหลอด ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

7. นำหลอดไปป้อนใน incubator shaker ที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8. หลังจากนั้นใช้ปิเปตคูดสารละลายในหลอดปริมาตร 50 ไมโครลิตร มา spread ลงบน LB plate ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และ X-gal ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ผสมไว้แล้ว

9. นำ LB plate ไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

10. เลือกลโคโลนีเดี่ยว ๆ สีขาวใสในหลอด LB medium ที่ผสม Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ไว้แล้วนำหลอดไปบ่มใน incubator shaker ที่ความเร็ว 250 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

11. หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit

## 2.2 การสกัดพลาสมิด DNA

ใช้ชุด QIAprep Spin Miniprep Kit โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการเลี้ยงมาผสมกับ บัฟเฟอร์ P1 (250 ไมโครลิตร) แล้วย้ายลงในหลอด microcentrifuge
2. เติมบัฟเฟอร์ P2 (250 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน โดยคว่ำหลอดกลับไปกลับมา 4-6 ครั้ง (ห้าม vortex)
3. เติมบัฟเฟอร์ N3 (350 ไมโครลิตร) และผสมให้เข้ากันทันที โดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมา 4-6 ครั้ง
4. นำไปหลอดปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 10 นาที
5. ปิเปตหรือเทของเหลวใสที่อยู่ด้านบนในหลอดใส่ลงไปใน QIAprep spin column
6. นำหลอดในข้อ 5 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 30-60 วินาที แล้วเทของเหลวที่ผ่าน column ที่
7. ล้าง QIAprep spin column โดยการเติมบัฟเฟอร์ PB 0.5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 30-60 วินาที แล้วเทของเหลวที่ผ่าน column ที่

8. ล้าง QIAprep spin column โดยเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13,000x g เป็นเวลา 30-60 วินาที

9. เทของเหลวกันหลอดออก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ส่วนที่เหลือออก

10. บรรจุ QIAprep column ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หรือน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่กลางหลอด QIAprep spin column ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 2 นาที

### 2.3 การหาลำดับเบสของเชื้อไวรัสหัดเหลือง

นำพลาสมิดที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นไปหาลำดับเบสโดยส่งตัวอย่างไปที่ MacroGen ประเทศเกาหลี นำผลของลำดับเบสที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสหัดเหลืองที่มีการรายงานใน GenBank (Accession No. EF156405, FJ848673 และ FJ194949) โดยการ Alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (EMBL-EBI)

## 3. การศึกษาพาหะการเกิดโรคหัดเหลืองในห้องปฏิบัติการ

### 3.1 การเตรียมเชื้อไวรัสหัดเหลืองเริ่มต้น

แยกเชื้อ YHV จากกุ่มป่วยซึ่งได้ตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วยการใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) รวมทั้งตรวจสอบว่ากุ่มที่ติดเชื้อดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนเชื้ออื่น แล้วนำกุ่มที่ติดเชื้อมาแยกเหงือกและนำมาบดใน TN buffer (20 mM Tris-HCL, 400 mM NaCl, pH 7.4) ในอัตราส่วน 1 : 10 (w/v) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องcentrifuge ที่ 3,000x g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนของเหลวใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge อีกครั้งหนึ่ง ที่อัตรา 8,000xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนของเหลวใสที่ได้ (supernatant) มากรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งสารละลายใส่หลอด หลอดละ 50 มิลลิลิตร และจัดเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสหัวเหลือง

นำสารละลายเชื้อที่เตรียมและจัดเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส มาวางให้ละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เจือจางเชื้อ 1: 100 เท่าด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อของหนูขาวเพศเมีย บริเวณกล้ามเนื้อปล้องที่ 3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหนู 1 ตัว (ใช้หนูขาวขนาด 10-15 กรัม) หลังจากฉีดเชื้อเมื่อถึงแสดงอาการของโรคชัดเจนหรือเริ่มมีอาการของโรค คุกเลือดเจือจางและจัดเก็บด้วยกระบอกชนิดยาโดยจะคุกเลือดบริเวณ โคนขาเดินคู่ที่ 3 แล้วเจือจางเลือด 1 ส่วนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 4 ส่วน รวมเลือดจากหนูทุกตัวผสมให้เข้ากันดีแล้วแบ่งใส่หลอดไครโอ หลอดละ 1 มิลลิลิตร ส่วนตัวหนูที่เหลือจัดเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป ตัวอย่างเลือดที่เจือจางแล้วนำมาตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และไม่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสอื่น

### 3.3 การศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสในสัตว์กลุ่มพาหะโดยการฉีดเชื้อและการกิน

ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย 2 การทดลอง โดยแบ่งเป็นการศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสในกลุ่มสัตว์พาหะ โดยการฉีดเชื้อ YHV เข้าทางกล้ามเนื้อในกลุ่มสัตว์พาหะ และการให้สัตว์พาหะปกติกินกิ้งขาวที่ติดเชื้อ YHV มีรายละเอียด ดังนี้

#### 3.3.1 การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสในสัตว์กลุ่มพาหะโดยการฉีดเชื้อ

เตรียม สัตว์พาหะ ที่ปลอดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ทดสอบโดยวิธี RT-PCR) ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วเบื้องต้นจากการทดลองที่ 1 ว่าสามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองมาเลี้ยงในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำจืดและดิน (จัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับชนิดของสัตว์พาหะที่ทำการ ทดลอง) และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา โดยจัดการทดลองในสัตว์พาหะแยกเป็นชนิด ซึ่งแต่ละชนิด ใช้จำนวน 4 ตู้ ๆ ละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยสัตว์พาหะที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ เป็นกลุ่มทดลอง โดยนำสัตว์พาหะมาศึกษาการเกิดโรคของเชื้อ YHV โดยนำสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 มาวางให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเม็ดเลือดด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว

1600Xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนไซมาเจี๊องด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ให้ได้เป็น  $10^{-5}$  เก็บเชื้อที่เจี๊องแล้วในน้ำแข็ง นิดเข้าสัตว์ทดลอง ในระดับความเข้มข้นละ 30 ตัว หากเป็นกึ่งขนาดเล็ก เช่น กึ่งฝอยจะใช้วิธีการแช่เชื้อในอัตราส่วน เชื้อ YHV 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำจืด 1 ลิตร

กลุ่มการทดลองที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ประกอบด้วยสัตว์พาหะที่เลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 1 ตู้ โดยสัตว์พาหะกลุ่มควบคุมจะฉีดสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.6 ในปริมาณเท่ากัน

สังเกตอาการ บันทึกจำนวนสัตว์ที่ตายเป็นเวลา 30 วัน ทำการสุ่มตัวอย่าง สัตว์พาหะดังกล่าว ในวันที่ 3, 7, 21 และ 30 วัน เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัว สัตว์พาหะด้วยวิธี RT-PCR สัตว์พาหะส่วนหนึ่งจะถูก fix ด้วย Davidson's fixative เพื่อทำการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่อไปตามวิธีของ Bell and Lightner (1998)

### 3.3.2 การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสในสัตว์กลุ่มพาหะโดยการกิน

เตรียมสัตว์พาหะชนิดต่าง ๆ ที่เป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองจากผลการทดลองที่ 1 ซึ่งปลอดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (ทดสอบโดยวิธี RT-PCR) มาเลี้ยงในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำจืดและดิน (จัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับชนิดของสัตว์พาหะที่ทำการทดลอง) และมีเครื่องให้อากาศตลอดเวลา โดยจัดการทดลองในสัตว์พาหะแยกเป็นชนิด ซึ่งแต่ละชนิด ใช้จำนวน 4 ตู้ ๆ ละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ประกอบด้วยสัตว์พาหะที่เลี้ยงในตู้กระจกจำนวน 3 ตู้ เป็นกลุ่มทดลองโดยจะให้สัตว์พาหะกินกึ่งขาวแวนนาไมที่ผ่านการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสจากข้อ 3.2 เป็นเวลา 3 วัน ๆ ละ 1 ครั้ง หลังจากนั้นให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป

กลุ่มการทดลองที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ประกอบด้วยสัตว์พาหะที่เลี้ยงในตู้กระจก จำนวน 1 ตู้ โดยสัตว์พาหะกลุ่มควบคุมจะ ให้กินเนื้อกึ่งขาวแวนนาไม ที่ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัส ให้กินติดต่อกัน 3 วัน หลังจากนั้นให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป

สังเกตอาการ บันทึกจำนวนสัตว์ที่ตายเป็นเวลา 30 วัน ทำการสุ่มตัวอย่าง สัตว์พาหะดังกล่าว ในวันที่ 3, 7, 21 และ 30 วัน เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัวสัตว์พาหะ ด้วยวิธี RT-PCR สัตว์พาหะส่วนหนึ่งจะถูก fix ด้วย Davidson's fixative เพื่อทำการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่อไปตามวิธีของ Bell and Lightner (1998)

#### 4. การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากพาหะสู่กึ่งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

4.1 การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของ เชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งขาวแวนนาไม จากสัตว์กลุ่มพาหะโดยการนำมาเลี้ยงร่วมกับกึ่งขาวแวนนาไม

เตรียมกึ่งขาวแวนนาไมที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีไวรัสชนิดต่าง ๆ นำมาปรับความเค็มเลี้ยงในตู้กระจก (ขนาด 30x 75x 40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำความเค็ม 3-5 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตรและมีเครื่องให้อากาศ จำนวน 20 ตู้ ๆ ละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 เลี้ยงร่วมกับกลุ่มสัตว์พาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง มาแล้ว 3 วัน  
ดังนี้



ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 2 เลี้ยงร่วมกับสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง มาแล้ว 7 วัน



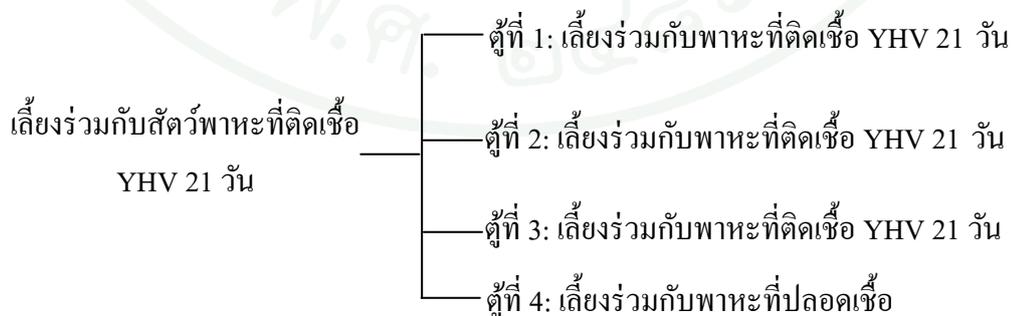
ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 3 เลี้ยงร่วมกับสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง มาแล้ว 14 วัน



ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 4 เลี้ยงร่วมกับสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง มาแล้ว 21 วัน



กลุ่มการทดลองที่ 5 เลี้ยงร่วมกับสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง มาแล้ว 28 วัน  
ดังนี้

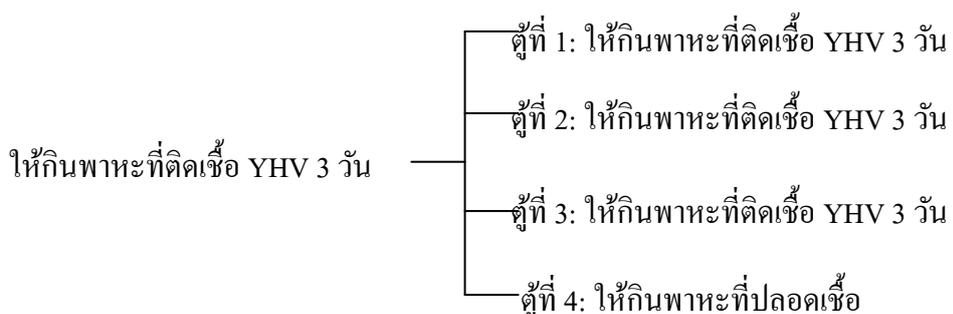


ลุ่มเก็บตัวอย่างร่างกายของพาหะแต่ละชนิดในแต่ละช่วงเวลา ที่ 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน หลังจากได้รับเชื้อ เพื่อตรวจสอบ การคงอยู่ของไวรัส YHV ในพาหะด้วยวิธี RT-PCR ก่อนนำไปเลี้ยงร่วมกับกึ่งทดลอง จากนั้น สังเกตอาการ บันทึกจำนวนกึ่งที่ตายเป็นเวลา 7 วัน และทำการลุ่มเก็บตัวอย่างขาว่ายน้ำของคู่ที่ 2 ของกึ่ง เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งขาวแอนนาไมด้วยวิธี RT-PCR ส่วนที่เหลือ fix ด้วย Davidson's fixative เพื่อทำการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่อไปตามวิธีของ Bell and Lightner (1998)

4.2 การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งขาวแอนนาไมจากสัตว์กลุ่มพาหะโดยการกิน

เตรียมกึ่งขาวแอนนาไมที่ผ่านการตรวจเชื้อว่าไม่มีไวรัสชนิดต่าง ๆ นำมาปรับความเค็ม เลี้ยงในตู้กระจก (ขนาด 30x75x40 เซนติเมตร) ภายในบรรจุน้ำความเค็ม 3-5 พีพีที ปริมาตร 80 ลิตรและมีเครื่องให้อากาศ จำนวน 20 คู่ ๆ ละ 10 ตัว โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มการทดลองที่ 1 ให้กินเนื้อสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองมาแล้ว 3 วัน ดังนี้



กลุ่มการทดลองที่ 2 ให้กินเนื้อสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองมาแล้ว 7 วัน ดังนี้



กลุ่มการทดลองที่ 3 ให้กินเนื้อสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองมาแล้ว 14 วัน ดังนี้



กลุ่มการทดลองที่ 4 ให้กินเนื้อสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองมาแล้ว 21 วัน ดังนี้



กลุ่มการทดลองที่ 5 ให้กินเนื้อสัตว์กลุ่มพาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองมาแล้ว 28 วัน ดังนี้



สุ่มเก็บตัวอย่างร่างกายของพาหะแต่ละชนิดในแต่ละช่วงเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน หลังจากได้รับเชื้อ เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของไวรัส YHV ในพาหะด้วยวิธี RT-PCR ก่อนนำไปให้ กุ้งทดลองกิน จากนั้นสังเกตอาการ บันทึกจำนวนกุ้งที่ตายเป็นเวลา 7 วัน และทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง ขาว่ายน้ำคู่ที่สองของกุ้งเพื่อตรวจสอบการ ติดเชื้อไวรัส หัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธี RT-PCR ส่วนที่เหลือ fix ด้วย Davidson's fixative เพื่อทำการศึกษาทาง ทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ต่อไปตามวิธีของ Bell and Lightner (1998)

##### 5. การศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัส สหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมจากการฉีดเชื้อไวรัส และ การให้กุ้งปกติกินกุ้งที่ป่วยแล้วนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

ใช้กุ้งขาวแวนนาไมปลอดเชื้อขนาดประมาณ 8-10 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยน้ำความเค็มต่ำมาเลี้ยงไว้ในถังไฟเบอร์กลาส แล้วนำมาปรับสภาพให้ได้ตามความเค็มในถัง ที่บรรจุน้ำความเค็ม 5, 15 และ 30 พีพีที เป็นเวลา 7 วัน ก่อนที่จะแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ทดลอง แต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ กลุ่มที่ 1 นำกุ้งทดลองมาเลี้ยงในตู้กระจกปริมาตร 100 ลิตร บรรจุน้ำ ความเค็ม 5 พีพีที ปริมาตรประมาณ 80 ลิตรจำนวน 3 ตู้แต่ละตู้ใส่กุ้งตู้ละ 10 ตัว ในขณะที่กลุ่มที่ 2 และ กลุ่มที่ 3 ทำการเลี้ยงเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ทุกอย่าง แต่ใช้น้ำความเค็ม 15 และ 30 พีพีที ในการ เลี้ยงกุ้งตามลำดับ จากนั้นเลี้ยงกุ้งทั้ง 3 กลุ่มเป็นเวลา 10 วันก่อนที่จะฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองซึ่งสกัด มาจากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคไวรัสหัวเหลืองจากจังหวัดราชบุรี ในปี พ .ศ. 2552 ตามวิธีของ OIE (2009) ก่อนที่จะฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่สกัดได้ เข้าไปในกลัมน้ำเกลือที่ 5 ของกุ้งทดลองทุกตัว ใน ปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตร สำหรับกลุ่มควบคุมจำนวน 3 ตู้บรรจุน้ำความเค็ม 5, 15 และ 30 พีพีที

ปริมาตรประมาณ 80 ลิตรใส่กึ่งตุ้ละ 10 ตัวและฉีดน้ำเกลือ 0.5 เปอร์เซ็นต์เข้าไปในกล้ามเนื้อปล้องที่ 5 ของกึ่งทดลองทุกตัว ในปริมาตรตัวละ 0.1 มิลลิลิตรจากนั้นเปรียบเทียบกับอัตราการรอดตายของกึ่งแต่ละกลุ่ม พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างกึ่งจากแต่ละกลุ่มมา รททดลองเพื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bell and Lightner (1998) รวมทั้งศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR

#### 6. การศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อ YHV

นำตัวอย่างสัตว์ทดลอง มาฉีดด้วยน้ำยาคงสภาพเควิดสัน (Davidson's fixative) เข้าไปในช่องปาก ส่วนหัวด้านหลังได้เปลือก คับและคับอ่อน ส่วนท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้ายและลำตัวทั้งด้านท้องและด้านหลังให้ทั่ว ตัดเปลือกกึ่งตามแนวยาวตั้งแต่เปลือกช่วงท้องปล้องที่ 6 จนถึงส่วนหัว หลังจากนั้นแช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้น้ำยามีปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อ เมื่อครบกำหนดย้ายตัวอย่างกึ่งไปแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ตัดชิ้นเนื้อกึ่งบริเวณที่ต้องการศึกษา บรรจุใน embedding cassette แล้วนำไปผ่าน ขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration), clearing และ infiltration ด้วยเครื่อง automatic tissue processor ตามวิธีการมาตรฐานของ Bell and Lightner (1998) จากนั้นนำชิ้นเนื้อ มาทำให้เป็นแท่งด้วยพาราฟิน (embedding) ตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร นำไปย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) และทำเป็นสไลด์ถาวร แล้วนำไปศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป (Lightner, 1996)

#### 7. การศึกษาการติดเชื้อ YHV ด้วยวิธี immunohistochemistry

นำสไลด์ ที่มีเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษามาละลายเอาพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffization) เติมน้ำเข้า (rehydration) และผ่านกระบวนการสำหรับการย้อม indirect peroxidase immunohistochemistry หยดโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (Sithigomgul *et al.*, 2002) หลังจากนั้นล้างแอนติบอดีตัวที่หนึ่งออกจากเนื้อเยื่อแล้วหยดแอนติบอดีตัวที่สอง ได้แก่ goat anti- mouse- HRP antibody ที่เจือจางกับ calf serum 10 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1: 1000 แล้วนำเนื้อเยื่อมาทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 3, 3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 0.03

เปอร์เซ็นต์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้น  
ย้อมด้วย eosin และทำเป็นสไลด์ถาวร นำไปศึกษาการติดเชื้อ YHV ด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป



## สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

### 1. สถานที่ทำการวิจัย

1.1 ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

1.2 ห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อวิทยา ไวรัสวิทยาและแบคทีเรียวิทยา สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง กรุงเทพมหานคร

1.3 ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร

### 2. ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552- มกราคม พ.ศ. 2554



ภาพที่ 1 ฟาร์มที่ทำการเก็บตัวอย่างสัตว์พาหะในจังหวัดราชบุรี



ภาพที่ 2 การลำเลียงสัตว์พาหะจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งจังหวัดราชบุรี



ภาพที่ 3 การเลี้ยงสัตว์พาหะที่มีเชื้อ YHV (ปูนา) ในตู้กระจก



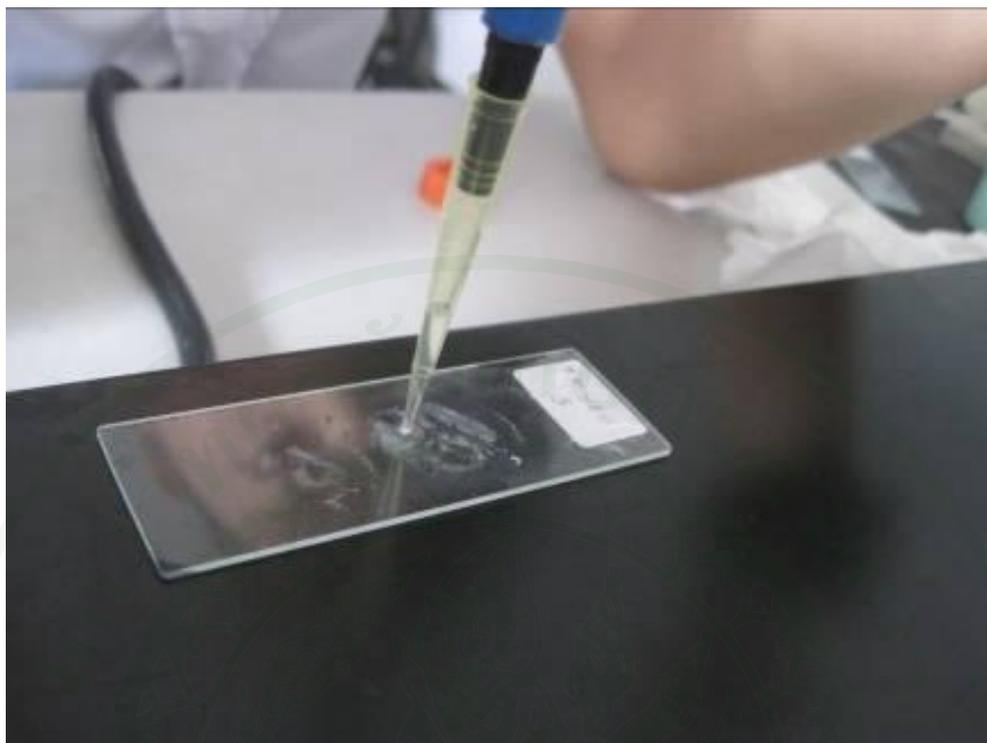
ภาพที่ 4 การทำให้สัตว์พาหะ (ปูนา) ติดเชื้อไวรัส YHV โดยวิธีการฉีดเชื้อ



ภาพที่ 5 กุ้งฝอยที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสโดยให้กินกุ้งขาวที่มีเชื้อ YHV



ภาพที่ 6 การทดลองเลี้ยงสัตว์พาหะที่มีเชื้อ YHV ร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม



ภาพที่ 7 การหยดโมโนโคลนอลแอนติบอดีลงบนเนื้อเยื่อในเทคนิค immunohistochemistry



ภาพที่ 8 การนำเนื้อเยื่อมา้อมด้วยสี eosin ในเทคนิค immunohistochemistry

## ผลและวิจารณ์

### 1. การศึกษาการเกิดโรคหัวเหลือง (Yellow-Head Disease; YHD) และชนิดของพาหะในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำ

ในการศึกษาการเกิดโรคหัวเหลืองและชนิดของพาหะในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่ ๆ เคยพบการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมตลอดปี พ.ศ. 2552 ในจังหวัดราชบุรี ทั้งหมด 29 ฟาร์ม มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4 พิกัดที่ตั้งของแต่ละฟาร์มในจังหวัดราชบุรี

พิกัดของจุดเก็บตัวอย่าง		
E	N	สถานี
099594376	1342567	ฟาร์มที่ 1
099513100	1337387	ฟาร์มที่ 2
099528350	1337977	ฟาร์มที่ 3
099526623	1338331	ฟาร์มที่ 4
099528947	1338560	ฟาร์มที่ 5
099535747	1339036	ฟาร์มที่ 6
099540208	1337462	ฟาร์มที่ 7
099575910	1341616	ฟาร์มที่ 8
099567195	1342332	ฟาร์มที่ 9
100003867	13388999	ฟาร์มที่ 10
099598899	13391995	ฟาร์มที่ 11
099598294	13392821	ฟาร์มที่ 12
100004842	13390755	ฟาร์มที่ 13
099599343	13395514	ฟาร์มที่ 14
099599412	13395433	ฟาร์มที่ 15
100001729	13396280	ฟาร์มที่ 16

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พิกัดของจุดเก็บตัวอย่าง		
E	N	สถานี
100011221	13392795	ฟาร์มที่ 17
100014747	13396077	ฟาร์มที่ 18
100012428	13394587	ฟาร์มที่ 19
100011156	13392102	ฟาร์มที่ 20
100011272	13392052	ฟาร์มที่ 21
100018264	13399622	ฟาร์มที่ 22
100019240	13398755	ฟาร์มที่ 23
100019658	13379092	ฟาร์มที่ 24
100003134	13394755	ฟาร์มที่ 25
100003747	13384684	ฟาร์มที่ 26
100012361	13400385	ฟาร์มที่ 27
100001757	13401826	ฟาร์มที่ 28
100005918	13396993	ฟาร์มที่ 29



ภาพที่ 9 แผนที่แสดงจุดเก็บตัวอย่างจากฟาร์มทั้ง 29 ฟาร์มในจังหวัดราชบุรี

ฟาร์มที่ 1 พิกัดที่  $13^{\circ} 42.5670' N$   $099^{\circ} 59.4376' E$  ตั้งอยู่ที่ตำบลคอนใหญ่ อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี ประกอบด้วยบ่อเลี้ยงกุ้งจำนวน 30 บ่อ ปัจจุบันเลี้ยงปลาปนรวมกับกุ้งขาวและกุ้งก้ามกราม

ฟาร์มที่ 2 พิกัดที่  $13^{\circ} 37.387' N$   $099^{\circ} 51.310' E$  ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลคอนทราย อำเภोधาราม จังหวัดราชบุรี เป็นคลองน้ำทิ้งร่วมของฟาร์มกุ้งขนาดเล็กจำนวน 3 ฟาร์ม มีจำนวนบ่อเลี้ยงทั้งหมดประมาณ 6 บ่อ มีรายงานพบกุ้งตายก่อนหน้านี้ประมาณ 2 สัปดาห์ ปัจจุบันกำลังเตรียมน้ำก่อนจะปล่อยกุ้งเพื่อเลี้ยงในรอบต่อไป

ฟาร์มที่ 3 พิกัดที่  $13^{\circ} 37.977' N$   $099^{\circ} 52.835' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลคอนทราย อำเภोधาราม จังหวัดราชบุรี เป็นคลองน้ำทิ้งของฟาร์ม จำนวน 2 ฟาร์มมีจำนวนบ่อกุ้งทั้งหมด 5 บ่อ ปัจจุบันกำลังเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

ฟาร์มที่ 4 พิกัดที่  $13^{\circ} 38.3316' N$   $099^{\circ} 52.6623' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณตำบลบ้านสิงห์ อำเภोधาราม จังหวัดราชบุรีเป็นคลองน้ำทิ้งร่วมของ 2 ฟาร์ม มีจำนวนบ่อกุ้งทั้งหมด 6 บ่อ เพิ่งพบกุ้งตายจึงจับกุ้ง

ฟาร์มที่ 5 พิกัดที่  $13^{\circ} 38.5605' N$   $099^{\circ} 52.8947' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณตำบลบ้านสิงห์ อำเภोधาราม จังหวัดราชบุรี เป็นคลองสาธารณะที่เกษตรกรจะสูบน้ำเข้าไปใช้ในฟาร์ม ปัจจุบันกำลังเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม มีจำนวนบ่อกุ้งทั้งหมด 2 บ่อ

ฟาร์มที่ 6 พิกัดที่  $13^{\circ} 39.0368' N$   $099^{\circ} 53.5747' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลบ้านสิงห์ อำเภोधาราม จังหวัดราชบุรี เป็นคลองสาธารณะอยู่หน้าฟาร์มซึ่งเกษตรกรจะสูบน้ำเข้าไปใช้ในฟาร์ม มีจำนวนบ่อกุ้งทั้งหมด 6 บ่อ

ฟาร์มที่ 7 พิกัด  $13^{\circ} 37.4622' N$   $099^{\circ} 54.0208' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณตำบลบ้านสิงห์ อำเภोधาราม จังหวัดราชบุรีเป็นคลองน้ำทิ้งของฟาร์ม มีจำนวนบ่อกุ้งทั้งหมด 20 บ่อ ปัจจุบันเพิ่งพบกุ้งตายจึงจับกุ้งจำนวน 1 บ่อ

ฟาร์มที่ 8 พิกัดที่  $13^{\circ} 41.6163' N$   $099^{\circ} 57.5910' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง เป็นฟาร์มเอกชน ตั้งอยู่บริเวณตำบลคอนเซ่ง อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีบ่อเลี้ยงจำนวน 30 บ่อ เลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจนอายุประมาณ 40 วัน พบกุ้งป่วยจึงปล่อยกุ้งก้ามกรามลงไปเลี้ยงเสริม คณะผู้วิจัยจึงเก็บตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งก้ามกรามในบ่อเพื่อตรวจเชื้อรวมทั้งเก็บตัวอย่างสัตว์พาหะ ในบ่อพักนั้นเพื่อตรวจเชื้อ

ฟาร์มที่ 9 พิกัดที่  $13^{\circ} 42.3320' N$   $099^{\circ} 56.7195' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลคอนเซ่ง อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี เป็นบ่อเลี้ยงที่ติดกับคลองชลประทาน มีจำนวนบ่อทั้งหมด 12 บ่อ

ฟาร์มที่ 10 พิกัดที่  $13^{\circ} 38.8999' N$   $100^{\circ} 00.3867' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม ร่วมกับกุ้งขาว ปล่อยปล่อยลงเลี้ยงได้ 1 เดือน

ฟาร์มที่ 11 พิกัดที่  $13^{\circ} 39.1995' N$   $099^{\circ} 59.8899' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกรามร่วมกับกุ้งขาว ปล่อยปล่อยลงเลี้ยงได้ 75 วัน

ฟาร์มที่ 12 พิกัดที่  $13^{\circ} 39.2821' N$   $099^{\circ} 59.8294' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ โดยเลี้ยงกุ้งก้ามกรามร่วมกับกุ้งขาว 1 บ่อ ส่วนบ่อที่เหลือ เลี้ยงกุ้งก้ามกรามอย่างเดียว

ฟาร์มที่ 13 พิกัดที่  $13^{\circ} 39.0755' N$   $100^{\circ} 00.4842' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 5 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกรามร่วมกับกุ้งขาว

ฟาร์มที่ 14 พิกัดที่  $13^{\circ} 39.5514' N$   $099^{\circ} 59.9343' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ โดยเลี้ยงกุ้งก้ามกรามร่วมกับกุ้งขาว

ฟาร์มที่ 15 พิกัดที่ 13°39.5433' N 099°59.9412'E ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 2 บ่อ โดยเลี้ยงกุ้ง ก้ามกรามร่วมกับกุ้งขาว

ฟาร์มที่ 16 พิกัดที่ 13°39.6280' N 100°00.1729'E ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม กับกุ้งขาว

ฟาร์มที่ 17 พิกัดที่ 13°39.2795' N 100°01.1221'E ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ โดยเลี้ยงกุ้ง ก้ามกรามร่วมกับกุ้งขาว

ฟาร์มที่ 18 พิกัดที่ 13°39.6077' N 100°01.4747'E ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 6 บ่อ โดยเลี้ยงกุ้ง ก้ามกรามล้วน

ฟาร์มที่ 19 พิกัดที่ 13°39.4587' N 100°01.2428'E ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 6 บ่อ โดยเลี้ยงกุ้ง ก้ามกรามเพียงอย่างเดียว

ฟาร์มที่ 20 พิกัดที่ 13°39.2102' N 100°01.1156'E ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ โดยเลี้ยงกุ้ง ก้ามกรามร่วมกับกุ้งขาว

ฟาร์มที่ 21 พิกัดที่ 13°39.2052' N 100°01.1272'E ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 2 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม ร่วมกับกุ้งขาว

ฟาร์มที่ 22 พิกัดที่  $13^{\circ}39.9622' N$   $100^{\circ}01.8264' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพียงอย่างเดียว

ฟาร์มที่ 23 พิกัดที่  $13^{\circ}39.8755' N$   $100^{\circ}01.9240' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 4 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพียงอย่างเดียว

ฟาร์มที่ 24 พิกัดที่  $13^{\circ}37.9092' N$   $100^{\circ}01.9658' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 5 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพียงอย่างเดียว

ฟาร์มที่ 25 พิกัดที่  $13^{\circ}39.4755' N$   $100^{\circ}00.3134' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพียงอย่างเดียว แต่มีประวัติเคยพบโรคหัวเหลืองระบาดตอนเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม่มาก่อน

ฟาร์มที่ 26 พิกัดที่  $13^{\circ}38.4684' N$   $100^{\circ}00.3747' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 5 บ่อ เลี้ยงกุ้งขาว ร่วมกับกุ้งก้ามกราม มีประวัติพบโรคหัวเหลือง 2 เดือนก่อนที่จะเก็บตัวอย่าง

ฟาร์มที่ 27 พิกัดที่  $13^{\circ}40.0385' N$   $100^{\circ}01.2361' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 4 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพียงอย่างเดียว

ฟาร์มที่ 28 พิกัดที่  $13^{\circ}40.1826' N$   $100^{\circ}00.1757' E$  ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพียงอย่างเดียว

ฟาร์มที่ 29 พิกัดที่ 13°39.6993' N 100°00.5918'E ลักษณะโดยทั่วไปของจุดเก็บตัวอย่าง ตั้งอยู่บริเวณ ตำบลโพหัก อำเภอบางแพ จังหวัดราชบุรี มีจำนวนบ่อทั้งหมด 3 บ่อ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม เพียงอย่างเดียว ไม่มีประวัติว่าเป็นโรคมามาก่อน

หลังจากนั้นนำตัวอย่างสัตว์ทั้งหมดมาตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธี RT-PCR จากการศึกษาครั้งนี้พบการติดเชื้อหัวเหลืองใน ทุกตัวอย่างที่รวบรวมจากฟาร์มที่ 8 ฟาร์มที่ 9 และ ฟาร์มที่ 24 โดยสัตว์ที่ตรวจพบ การติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในฟาร์มดังกล่าวได้แก่ กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ซึ่งมีเลี้ยงกันมากบริเวณที่เก็บตัวอย่างและเกษตรกรหลายรายนิยม เลี้ยงร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม นอกจากนี้พาหะอื่น ๆ ที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้แก่ กุ้ง ฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) และปูนา (*Somanniathelphusa germaini*) ดังแสดงในรายละเอียด ต่อไปนี้



ภาพที่ 10 กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)



ภาพที่ 11 กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*)



ภาพที่ 12 ปูนา (*Somanniathelphusa germaini*)

ตารางที่ 5 แสดงชนิดและจำนวนของสัตว์ที่ทำการสำรวจและสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในฟาร์ม

ชื่อวิทยาศาสตร์ของสัตว์ที่ทำการสำรวจ	ชื่อสามัญ	จำนวนทั้งหมด/ จำนวนที่ติดเชื้อ
<i>Somaniathelphusa</i>	Freshwater crab (ปูนา)	25/10
<i>Hemiptera</i> (order)	Water strider (แมลงคานา)	267/0
Gerridae(family)	Pond skaters (จิงโจ้น้ำ)	160/0
Epitheca (genus)	Basket tails (แมลงปอ)	44/0
Chironomidae (family)	Blood worm (หนอนแดง)	405/0
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Giant freshwater prawn (กุ้งก้ามกราม)	345/225
<i>Macrobrachium lanchesteri</i>	Lanchester's freshwater prawn (กุ้งฝอย)	225/10
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp (กุ้งขาวแวนนาไม)	40/5
<i>Gambusia affinis</i>	Mosquito fish (ปลากินยุง)	90/0
<i>Trichogaster trichopterus</i>	Three spot Gourami (ปลากระดี่หม้อ)	105/0
<i>Filopaludina martensi</i>	River snail (หอยขม)	34/0

จากผลการศึกษาดังกล่าว จึงได้เลือกปูนา (*Somaniathelphusa germaini*), กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) และกุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) ซึ่งพบการติดเชื้อจากพื้นที่การเลี้ยงเป็นสัตว์ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการมีชีวิตอยู่ของไวรัสหัวเหลืองในพาหะเหล่านี้และการถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากพาหะทั้งสามชนิดนี้ไปยังกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ

## 2. การจำแนกชนิดของไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมโดยวิธีทางชีวโมเลกุล

ผลจากการศึกษา ลำดับเบสของ PCR- product ซึ่งเป็น envelope structural glycoprotein ขึ้นของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ทำการศึกษานี้ โดยวิธี DNA Sequencing โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่มีการรายงานใน GenBank (Accession No. EF156405, FJ848673 และ FJ194949) โดยการ Alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (EMBL-EBI) พบว่าเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ทำการศึกษานี้เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ YHV1-b ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Senapin *et al.*(2010) แสดงในภาพที่ 13 เห็นได้ว่าลำดับเบสของไวรัส

หัวเหลืองที่ทำการศึกษามีส่วนที่เหมือนกับ ไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ 1-b เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์และแตกต่างกับสายพันธุ์ 1-a อย่างชัดเจนตรงที่มีลำดับเบสของ โปรตีน gp116 ที่ขาดหายไป

```

EF156405 -----ATGCAA 6
FJ848673   TCCAATTAATTGGTCAATTACAACCTAAATTTTCGTAACAAAGCAGGCCTAGCTATGCAA 21000
YHV
FJ194949   TCCAATTAATTGGTCAATTACAACCTAAATTTTCGTAACAAAGCAGGCCTAGCTATGCAA 471

EF156405   TG TTCGCGATCATTACCATGCACTTCTCATCCTTTTCGCTCCCAGCCATTTTCATCTTCT 66
FJ848673   TG TTCGCGATCATTACCATGCACTTCTCATCCTTTTCGCTCCCAGCCATTTTCATCTTCT 21060
YHV
FJ194949   TG TTCGCGATCATTACCATGCACTTCTCATCCTTTTCGCTCCCAGCCATTTTCATCTTCT 531

EF156405   ACTGGGCTGCGGGGCTTATTTCTGACCTTCTCTTATCTACTTTACTCTCTGGTTCTGGG 126
FJ848673   ACTGGGCTGCGGGGCTTATTTCTGACCTTCTCTTATCTACTTTACTCTCTGGTTCTGGG 21120
YHV
FJ194949   ACTGGGCTGCGGGGCTTATTTCTGACCTTCTCTTATCTACTTTACTCTCTGGTTCTGGG 591

EF156405   GTTCATGGCTTCTTGCTACAATTTGCTACTCCCTCACATTTCTCTGGACGCAGGCACAACA 186
FJ848673   GTTCATGGCTTCTTGCTACAATTTGCTACTCCCTCACATTTCTCTGGACGCAGGCACAACA 21180
YHV
FJ194949   GTTCATGGCTTCTTGCTACAATTTGCTACTCCCTCACATTTCTCTGGACGCAGGCACAACA 651

EF156405   AGGACAAATCTATATTCTATCAACGTGCAACAACACAATCCGTACAATAAAAAGAAATCT 246
FJ848673   AGGACAAATCTACTATTTCTATCAACGTGCAACAACACAATCCGTACAATAAAAAGAAATCT 21240
YHV   -----CTATCAACGTGCAACAACACAATCCGTACAATAAAAAGAAATCT 42
FJ194949   AGGACAAATCTATATTCTATCAACGTGCAACAACACAATCCGTACAATAAAAAGAAATCT 711
   *****

EF156405   TGTCATCTAAGTTCGCTTAAGTCTGAGGTCTCCTGCTTTTACGATGAACACATTCATGAC 306
FJ848673   TGTCATCTAAGTTCGCTTAAGTCTGAGGTCTCCTGCTTTTACGATGAACACATTCATGAC 21300
YHV   TGTCATCTAAGTTCGCTTAAGTCTGAGGTCTCCTGCTTTTACGATGAACACACATTCATGAC 102
FJ194949   TGTCATCTAAGTTCGCTTAAGTCTGAGGTCTCCTGCTTTTACGATGAACACATTCATGAC 771
   *****

EF156405   ATTTCTGCACCAGGCTCGCATATCATTTTATACAATTGGTTTTGCTTACCTGAAAACAGAT 366
FJ848673   ATTTCTGCACCAGGCTCGCATATCATTTTATACAATTGGTTTTGCTTACCTGAAAACAGAT 21360
YHV   ATTTCTGCACCAGGCGCGCATATCATTTTATACAATTGGTTTTGCTTACCTGAAAACAGAT 162
FJ194949   ATTTCTGCACCAGGCGCGCATATCATTTTATACAATTGGTTTTGCTTACCTGAAAACAGAT 831
   *****

EF156405   TATGAATGTAAAGAAGGATATCCTCCCGCCAACACCGTCCAACGATACTTCCTTGCTATT 426
FJ848673   TATGAATGTAAAGAAGGATATCCTCCCGCCAACACCGTCCAACGATACTTCCTTGCTATT 21420
YHV   TATGAATGTAAAGAAGGATATCCTCCCGCCAACACCGTCCAACGATACTTCCTTGCTATT 222
FJ194949   TATGAATGTAAAGAAGGATATCCTCCCGCCAACACCGTCCAACGATACTTCCTTGCTATT 891
   *****

EF156405   TTATACCTTAGCATCTGTCTCTTCTAGCCTACATTTTCACTAAAATCACTCCTATCGCT 486
FJ848673   TTATACCTTAGCATCTGTCTCTTCTAGCCTACATTTTCACTAAAATCACTCCTATCGCT 21480
YHV   TTATACCTTAGCATCTGTCTCTTCTAGCCTACATTTTCACTAAAATCACTCCTATCGCT 282
FJ194949   TTATACCTTAGCATCTGTCTCTTCTAGCCTACATTTTCACTAAAATCACTCCTATCGCT 951
   *****

EF156405   AAATCCTTCATCTCTTCATGCTTTCAAACCTGAATATATCATGGAACCGATCGAAACTGAA 546
FJ848673   AAATCCTTCATCTCTTCATGCTTTCAAACCTGAATATATCATGGAACCGATCGAAACTGAA 21540
YHV   AAATCCTTCATCTCTTCATGCTTTCAAACCTGAATATATCATGGAACCGATCGAAACTGAA 342
FJ194949   AAATCCTTCATCTCTTCATGCTTTCAAACCTGAATATATCATGGAACCGATCGAAACTGAA 1011
   *****

EF156405   AAAGCCAAGTGACTGTTGCCCATGATAGACATAAGCTCACACCAACAAGTTGCCATTCT 606
FJ848673   AAAGCCAAGTGACTGTTGCCCATGATAGACATAAGCTCACACCAACAAGTTGCCATTCT 21600
YHV   AAAGGTCAAGTGACTGTTGCCCATGATAGACATAAGCTCACACCAACAAGTTGCCATTCT 402
FJ194949   AAAGGTCAAGTGACTGTTGCCCATGATAGACATAAGCTCACACCAACAAGTTGCCATTCT 1071
   *****

```

EF156405 ATTCTCAACTCCACTTTCAATCTTCTAGTTATTGGATGTTTCATATTTCTATGTTTCTTC 666  
 FJ848673 ATTCTCAACTCCACTTTCAATCTTCTAGTTATTGGATGTTTCATATTTCTATGTTTCTTC 21660  
 YHV ATTCTCAACTCCACTTTCAATCTTCTAGTTATTGGATGTTTCATATTTCTATGTTTCTTC 462  
 FJ194949 ATTCTCAACTCCACTTTCAATCTTCTAGTTATTGGATGTTTCATATTTCTATGTTTCTTC 1131  
 \*\*\*\*\*

EF156405 ATCACTCCTGCTTTCGCCACGATTCTAAGTGGAATTCCTGAAAAAGACAAGTCAGTCCTC 726  
 FJ848673 ATCACTCCTGCTTTCGCCACGATTCTAAGTGGAATTCCTGAAAAAGACAAGTCAGTCCTC 21720  
 YHV ATCACTCCTTCTTCGCCACGATTCTAAGTGGAATTCCTGAAAAAGA----- 509  
 FJ194949 ATCACTCCTGCTTTCGCCACGATTCTAAGTGGAATTCCTGAAAAAGA----- 1178  
 \*\*\*\*\*

EF156405 ATGGCTCCCCACGTGCTTTTTGAGGCCGGTCAACCAACTGAGCTTTCAGACTGCATCCAT 786  
 FJ848673 ATGGCTCCCCACGTGCTTTTTGAGGCCGGTCAACCAACTGAGCTTTCAGACTGCATCCAT 21780  
 YHV -----  
 FJ194949 -----

EF156405 TGGGCTGCTAATGGTGACTGTTTCTGCAACTCTACCAACTGCGACTGGAGTGAACACGTT 846  
 FJ848673 TGGGCTGCTAATGGTGACTGTTTCTGCAACTCTACCAACTGCGACTGGAGTGAACACGTT 21840  
 YHV -----  
 FJ194949 -----

EF156405 CAAACTCTTTGCTCTCAAACCTGTAACACATCATCTCCCACTACAACCTTCTTACTACA 906  
 FJ848673 CAAATCTTTGCTCTCAAACCTGTAACACATCATCTCCCACTACAACCTTCTTACTACA 21900  
 YHV -----ATCATCTCCCACTACAACCTTCTTACTACA 540  
 FJ194949 -----ATCATCTCCCACTACAACCTTCTTCTGCCACA 1209  
 \*\*\*\*\*

EF156405 CAATCTCTCCGTCTTCCACTCCTTCTAGTGACGCCGATAATCCTTGTGTTGCACAGGAC 966  
 FJ848673 CAATCTCTCCGTCTTCCACTCCTTCTAGTGACGCCGATAATCCTTGTGTTGCACAGGAC 21960  
 YHV CAATCCCTTCCGTCTTCCACTCCTTCTAGTGACGCCGATAATCCTTGTGTTGTACAGGAC 600  
 FJ194949 CAATCTCTCCGTCTTCCACTCCTTCTAGTGACGCCGATAATCCTTGTGTTGCACAGGAC 1269  
 \*\*\*\*\*

EF156405 GATGCCGGTTGTTACAGCTATCTTAATGACTATGACGAATCAAAACGTACACAAGCCATT 1026  
 FJ848673 GATGCCGGTTGTTACAGCTATCTTAATGACTATGACGAATCAAAACGTACACAAGCCATT 22020  
 YHV GATGCCGGTTGTTACAGCTATCTTAATGACTATGACGAATCAAAACGTACACAAGCCATT 660  
 FJ194949 GATGCCGGTTGTTACAGCTATCTTAATGACTATGACGAATCAAAACGTACACAAGCCATT 1329  
 \*\*\*\*\*

EF156405 AAATACACATACACACTCAGCACAAAGAAAACACCACATATGAATGCAATCCTAACTACT 1086  
 FJ848673 AAATACACATACACACTCAGCACAAAGAAAACACCACATATGAATGCAATCCTAACTACT 22080  
 YHV AAATACACATACACACTCAGCACAAAGAAATACACCACATATGAATGCAATCCTAACTACT 720  
 FJ194949 AAATACACATACACACTCAGCACAAAGAAATACACCACATATGAATGCAATCCTAACTACT 1389  
 \*\*\*\*\*

EF156405 GAGCAATTTGAAGAAATGTCTTTAGATGAAGCAAGATACTCTGACATTGTATCTTTATAC 1146  
 FJ848673 GAGCAATTTGAAGAAATGTCTTTAGATGAAGCAAGATACTCTGACATTGTATCTTTATAC 22140  
 YHV GAGCAATTTGAAGAAATGTCTTTAGATGAAGCAAGATACTCTGACATTGTATCTTTATAC 780  
 FJ194949 GAGCAATTTGAAGAAATGTCTTTAGATGAAGCAAGATACTCTGACATTGTATCTTTATAC 1449  
 \*\*\*\*\*

EF156405 CGAATCAATAACATAACATCAGTCCCTGGCTGTATGTACAATCCAGTATCATACTATCTC 1206  
 FJ848673 CGAATCAATAACATAACATCAGTCCCTGGCTGTATGTACAATCCAGTATCATACTATCTC 22200  
 YHV CGAATCAATAACATAACATCAGTCCCTGGCTGTATGTACAATCCAGTATCATACTATCTC 840  
 FJ194949 CGAATCAATAACATAACATCAGTCCCTGGCTGTATGTACAATCCAGTATCATACTATCTC 1509  
 \*\*\*\*\*

EF156405 CATGGCGACTCTGTTCCCTGTTACTTGTCCATCAACACCAAGATCTTTCGGTACAACCTAC 1266  
 FJ848673 CATGGCGACTCTGTTCCCTGTTACTTGTCCATCAACACCAAGATCTTTCGGTACAACCTAC 22260  
 YHV CATGGCGACTCTGTTCCCTGTTACTTGTCCATCAACACCAAGATCTTTCGGTACAACCTAC 900  
 FJ194949 CATGGCGACTCTGTTCCCTGTTACTTGTCCATCAACACCAAGATCTTTCGGTACAACCTAC 1569  
 \*\*\*\*\*

EF156405 AATCATCAAATCAGTAGTCAAATTTTGTATAATCACAAAATGGTAAATGTTACAGTAGAT 1326  
 FJ848673 AATCATCAAATCAGTAGTCAAATTTTGTATAATCACAAAATGGTAAATGTTACAGTAGAT 22320  
 YHV AATCATCAAATCAGTAGTCAAATTTTGTATAATCACAAAATGGTAAATGTTACAGTAGAT 960  
 FJ194949 AATCATCAAATCAGTAGTCAAATTTTGTATAATCACAAAATGGTAAATGTTACAGTAGAT 1629  
 \*\*\*\*\*

EF156405	CAACGTTGCAAAACACATTCTGATAACTGTTGGGCTTATTATAACAAGGCATCGAAAAGC	1386
FJ848673	CAACGTTGCAAAACACATTCTGATAACTGTTGGGCTTATTATAACAAGGCATCGAAAAGC	22380
YHV	CAACGTTGCAAAACACATTCTGATAACTGTTGGGCTTATTATAACAAGGCATCGAAAAGC	1020
FJ194949	CAACGTTGCAAAACACATTCTGATAACTGTTGGGCTTATTATAACAAGGCATCGAAAAGC	1689
*****		
EF156405	ATTTTTATCCAATTCCATCCCAGCTATGCTCAGAAGTATCATAATAGAATATTAGAGCCC	1446
FJ848673	ATTTTTATCCAATTCCATCCCAGCTATGCTCATAAGTATCATAATAGAATATTAGAGCCC	22440
YHV	ATTTTTATCCAATTCCATCCCAGCTATGCTCAGAAGTATCATAATAGAATATTAGAGCCC	1080
FJ194949	ATTTTTATCCAATTCCATCCCAGCTATGCTCAGAAGTATCATAATAGAATATTAGAGCCC	1749
*****		
EF156405	ACTACATTAATTATTCCATTCTATCCTCCAGAGACACTAAAACACTAGCCACACATCTT	1506
FJ848673	ACTACATTAATTATTCCATTCTATCCTCCAGAGACACTAAAACACTAGCCACACATCTT	22500
YHV	ACTACATTAATTATTCCATTCTATCCTCCAGAGACACTAAAACACTAGCCACTCATCTT	1140
FJ194949	ACTACATTAATTATTCCATTCTATCCTCCAGAGACACTAAAACACTAGCCACACATCTT	1809
*****		
EF156405	GGTCCTCGCGTTCTTCGTAATGCCGGTGATTATCAAATTTTCCTTGAACCTGGCTGGCTC	1566
FJ848673	GGTCCTCGCGTTCTTCGTAATGCCGGTGATTATCAAATTTTCCTTGAACCTGGCTGGCTC	22560
YHV	GGTCCTCGCGTTCTTCGTAATGCCGGTGATTATCAAATTTTCCTTGAACCTGGCTGGCTC	1200
FJ194949	GGTCCTCGCGTTTCGTAATGCCGGTGATTATCAAATTTTCCTTGAACCTGGCTGGCTC	1869
***** * *****		
EF156405	GGTAGAACATACCTTGACGGTTATCTTATCATGAAATTTATGCATCCACACGTCACGAT	1626
FJ848673	GGTAGAACATACCTTGACGGTTATCTTATCATGAAATTTATGCATCCACACGTCACGAT	22620
YHV	GGTAGCACATACCTTGACGGTTATCTTATCATGAAATTTATGCATCCACAC-----	1252
FJ194949	GGTAGAACATACCTTGACGGTTATCTTATCATGAAATTTATGCATCCACACGTCACGAT	1929
*****		
EF156405	TGCCGTTGCAACATGATGTCCGGCGACAATAAGTATGGTATTAACCTCGGAGATGACGTC	1686
FJ848673	TGCCGTTACAACATGATGTCCGGCGACAATAAGTATGGTACTAACCTCGGAGATGATGTC	22680
YHV	-----	
FJ194949	TGCCGTTACAACATGATGTCCGGCGACAATAAGTATGGTATAAACCTCGGAGATGACGTC	1989

**ภาพที่ 13** การทำ Alignment ของลำดับเบสของ envelope structural glycoprotein ยีนของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ทำการศึกษาในครั้งนี้กับ เชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ 1-a ที่ระบาดในประเทศไทย (EF156405, FJ848673) และเชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ 1-b ที่พบระบาดในกุ้งขาวแวนนาไมของไทย (FJ194949)

### 3. การศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในพาหะของโรคหัวเหลืองในห้องปฏิบัติการ

3.1 การศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสในสัตว์กลุ่มพาหะได้แก่ปูนา กุ้งก้ามกราม และกุ้งฝอย (โดยในปูนาและกุ้งก้ามกรามจะใช้วิธีฉีดเชื้อ ส่วนกุ้งฝอย เนื่องจากมีขนาดเล็กจะใช้วิธีการแช่เชื้อ)

เมื่อนำปูนา (*Somaniathelphusa germaini*), กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ปลอดเชื้อไวรัสมาฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่สกัดจากกุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) ปลอดเชื้อ มาแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลือง ที่สกัดจากกุ้งขาวแวนนาไม

จากนั้นสังเกต อัตราการตายและตรวจการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวพบว่าสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิด ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการตรวจด้วยวิธี RT-PCR อย่างไรก็ตามสัตว์พาหะทั้งหมดที่ทำการศึกษาไม่แสดงอาการป่วยและไม่พบการตายของสัตว์ทดลองทุกตัวที่ผ่านการฉีด ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (กึ่งขาวแวนนาไม) ซึ่งพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและกึ่งทดลองตายหมดภายในเวลา 7 วัน ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อัตราการตายสะสมและการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสะสมของสัตว์ทดลองหลังจากผ่านการฉีดและแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

สัตว์ทดลอง (30)	อัตราการตายสะสมของสัตว์				จำนวนสัตว์ที่ติดเชื้อ YHV สะสม				
	วัน 7	14	21	28	วัน 7	14	21	28	
กึ่งขาวแวนนาไม	30	-	-	-	30	-	-	-	
กึ่งกำมGRAM	0	0	0	0	30	30	30	0	
กึ่งฝอย	0	0	0	0	30	30	0	0	
ปูนา	0	0	0	0	30	30	30	0	

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิดที่ทำการศึกษานั้น ทนทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลากว่า 28 วัน โดยกึ่งกำมGRAM และปูนาที่ได้รับเชื้อสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้หมดภายในเวลา 28 วัน ในขณะที่กึ่งฝอยทั้งหมดสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ภายในเวลา 21 วัน

### 3.2 การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัสในสัตว์กลุ่มพาหะโดยการให้กินกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

เมื่อนำปูนา กึ่งกำมGRAM และกึ่งฝอยที่ปลอดเชื้อไวรัสมาให้กินกึ่งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากนั้นสังเกตอัตราการตายและตรวจการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวพบว่าสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิด ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการตรวจด้วยวิธี RT-PCR อย่างไรก็ตามสัตว์พาหะทั้งหมดที่ทำการศึกษาไม่แสดงอาการป่วยและไม่พบการตายของสัตว์ทดลองทุกตัวที่กินกึ่งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (กึ่งขาวแวนนาไม) ซึ่งพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและทำให้กึ่งทดลองตาย ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 อัตราการตายสะสมของสัตว์ทดลองและจำนวนสัตว์ที่ติดเชื้อ YHV สะสมหลังจากให้กินกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

สัตว์ทดลอง (30)	อัตราการตายสะสมของสัตว์				จำนวนสัตว์ที่ติดเชื้อ YHV สะสม				
	วัน 7	14	21	28	วัน 7	14	21	28	
กึ่งขาวแวนนาไม	11	30	-	-	30	30	-	-	
กึ่งกำมกราม	0	0	0	0	30	30	13	0	
กึ่งฝอย	0	0	0	0	30	18	0	0	
ปูนา	0	0	0	0	30	22	9	0	

ผลการศึกษานี้คล้าย กับผลการติดเชื้อไวรัส หัวเหลืองเข้าไปในสัตว์พาหะแต่ละกลุ่ม โดยกึ่งกำมกรามที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการกินสามารถกำจัดไวรัสหัวเหลืองออกจากตัวทั้งหมดภายในเวลา 28 วัน ในขณะที่กึ่งฝอยและปูนาที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยการกินกึ่งที่ติดเชื้อสามารถกำจัดไวรัสออกจากตัวทั้งหมดได้เป็นเวลา 21 วันและ 28 วันตามลำดับ อย่างไรก็ตาม กลุ่มสัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสจากการฉีดจะสามารถกำจัดไวรัสออกจากตัวได้ช้ากว่ากลุ่มสัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสจากการกินกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ทั้งนี้ เนื่องจากปริมาณไวรัสหัวเหลืองที่สัตว์พาหะแต่ละตัวได้รับ จากการฉีดเข้าไปในร่างกายโดยตรงน่าจะมีปริมาณมากกว่า การได้รับเชื้อผ่านการกินกึ่งที่ติดเชื้อและสัตว์ทุกตัวจะได้รับปริมาณเชื้อไวรัสในปริมาณที่เท่ากัน แต่ต่างจากการได้รับเชื้อโดยการกินกึ่งที่ติดเชื้อเพราะ สัตว์ทดลองแต่ละตัวสามารถกินกึ่งขาวที่ติดเชื้อในปริมาณที่ไม่เท่ากัน ทำให้ได้รับไวรัสเข้าสู่ร่างกายในปริมาณที่แตกต่างกันส่ง ผลทำให้สัตว์ทดลองแต่ละตัว ใช้เวลาในการ กำจัดไวรัสหัว เหลือง ออกจากตัวได้ ไม่เท่า กันด้วย โดยจะเห็นได้ว่า กึ่งกำมกรามบางตัวที่กินกึ่งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ในปริมาณน้อยก็จะมีเชื้อไวรัสในตัวน้อยจึง สามารถกำจัดไวรัสดังกล่าวออกจากตัวได้ เร็วภายในเวลาเพียง 21 วัน ในขณะที่กึ่งฝอยจำนวน 12 ตัวและปูนาจำนวน 8 ตัวสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองออกจากตัวได้ภายในเวลาเพียง 14 วัน ผลการศึกษานี้มีความแตกต่าง จากการศึกษาของ Longyant *et al.* (2005) ซึ่งทดลองฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ YHV-1a เข้าไปในกึ่งกำมกราม กึ่งฝอย พบว่ากึ่งกำมกรามไม่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในขณะที่กึ่งฝอยติดเชื้อไวรัสแต่ไม่พบการตาย นอกจากนี้การทดลองฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูนาและให้ปูนา กินกึ่งขาวที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองพบว่าปูนาที่ใช้ในการศึกษานี้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง แตกต่างจากการศึกษาของ Longyant *et al.* (2006) ซึ่งศึกษาการติดเชื้อไวรัส

ห้วเหลืองในปูจำนวน 16 ชนิดในพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการและรายงานว่าปูทุกชนิดที่ทำการศึกษามิติดเชื้อไวรัสห้วเหลือง ผลการศึกษาที่แตกต่างกันนี้ น่าจะเนื่องมาจากสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสห้วเหลืองที่ทำการศึกษามีความแตกต่างกัน จึงมีความสามารถในการยอมรับพาหะแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสำหรับสายพันธุ์เชื้อไวรัสห้วเหลืองในการศึกษาคั้งนี้คือ YHV-1b ซึ่งมีความแตกต่างจากไวรัสห้วเหลือง YHV-1a ที่ระบาศในการเลี้ยงกุ้งกุลาคำตามรายงานของ Longyant *et al.* (2005, 2006) ตรงที่ไกลโคโปรตีน gp116 ซึ่งเป็นโปรตีนหุ้มจีโนมของไวรัสห้วเหลืองสายพันธุ์ YHV-1a ได้หายไปนไวรัส YHV-1b ซึ่งปกติแล้วไกลโคโปรตีนที่มีหน้าที่หุ้มจีโนมของไวรัสแต่ละชนิดจะมีบทบาทในการจดจำเข้าบ้านที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้น ๆ ด้วย (Chuchird *et al.*, 2002) จึงน่าจะส่งผลให้การยอมรับของเข้าบ้านของไวรัสทั้งสองชนิดนี้จึงแตกต่างกัน

#### 4. ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสห้วเหลืองจากพาหะสู่กุ้งขาวแวนนาไม

##### 4.1 การทดสอบการเกิดโรคห้วเหลืองโดยการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมร่วมกับพาหะที่ติดเชื้อไวรัสห้วเหลือง

เมื่อนำกลุ่มสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิดได้แก่ กุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยและปูนาที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสห้วเหลือง โดยวิธีการกินกุ้งขาวที่ติดเชื้อ เป็นเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วันก่อนนำไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 8-10 กรัมที่ปลอดเชื้อจำนวน 20 ตัว ๆ ละ 10 ตัว (ต่อพาหะหนึ่งชนิด) แบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัวโดยเลี้ยงกุ้งร่วมกับพาหะแต่ละชนิดเป็นเวลา 7 วันแล้วสังเกตอัตราการตายและทดสอบการติดเชื้อไวรัสห้วเหลืองด้วยวิธี RT-PCR ได้ผลตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายหลังจากเลี้ยงร่วมกับสัตว์พาหะทั้งสามชนิดที่ติดเชื้อ YHV เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดของ สัตว์พาหะที่ เลี้ยงร่วม	จำนวนวัน หลังจากสัตว์ พาหะได้รับ เชื้อ	กลุ่มทดลอง			ค่าเฉลี่ย	ค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน	กลุ่มควบคุม
		ซ้ำที่	ซ้ำที่	ซ้ำที่			
		1	2	3			
ปูนา	3	10	10	10	10	0	0
	7	10	10	10	10	0	0
	14	7	6	7	6.67	0.57	0
	21	2	0	1	1	0	0
กุ้งก้ามกราม	3	10	10	10	10	0	0
	7	8	6	7	7	1	0
	14	3	1	1	1.67	1.15	0
	21	1	1	1	1	0	0
กุ้งฝอย	3	10	10	10	10	0	0
	7	6	9	7	6.33	0.57	0
	14	1	2	1	1.33	0.57	0

หมายเหตุ: ปูนาและกุ้งก้ามกรามที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 28 วัน และกุ้งฝอยที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 21 วันสามารถกำจัดเชื้อไวรัสดังกล่าวออกจากตัวได้หมดจากการตรวจการติดเชื้อโดยวิธี RT-PCR จึงไม่นำสัตว์พาหะกลุ่มดังกล่าวมาเลี้ยงร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม

ตารางที่ 9 ผลการตรวจพบเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธี RT-PCR หลังจากเลี้ยงร่วมกับสัตว์พาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 7 วัน

ชนิดของ สัตว์พาหะที่ เลี้ยงร่วม	จำนวนวัน หลังจากสัตว์ พาหะได้รับเชื้อ	กลุ่มทดลอง			ค่าเฉลี่ย	ค่า	
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		เบี่ยงเบน มาตรฐาน	กลุ่มควบคุม
ปูนา	3	10	10	10	10	0	0
	7	10	10	10	10	0	0
	14	10	10	10	10	0	0
	21	10	10	10	10	0	0
กุ้งก้ามกราม	3	10	10	10	10	0	0
	7	10	10	10	10	0	0
	14	10	10	10	10	0	0
	21	10	10	10	10	0	0
กุ้งฝอย	3	10	10	10	10	0	0
	7	10	10	10	10	0	0
	14	10	10	10	10	0	0

หมายเหตุ: ปูนาและกุ้งก้ามกรามที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 28 วัน และกุ้งฝอยที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 21 วันสามารถกำจัดเชื้อไวรัสดังกล่าวออกจากตัวได้หมดจากการตรวจการติดเชื้อโดยวิธี RT-PCR จึงไม่นำสัตว์พาหะกลุ่มดังกล่าวมาเลี้ยงร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม

การศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ปลอดเชื้อร่วมกับกุ้งก้ามกรามกุ้งฝอยและปูนาที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง นั้น สามารถทำให้เกิดการ ถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ YHV-1b จากพาหะดังกล่าวไปยังกุ้งปกติได้ โดยกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงร่วมกับสัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน จะสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังกุ้งทดลองได้มากที่สุด เห็นได้จากอัตราการตายของกุ้งทดลองที่สูงกว่า กลุ่มอื่นๆ และอัตราการตายของกุ้งทดลองจะลดลงเรื่อยๆถ้าเลี้ยงร่วมกับสัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลานานขึ้นคือ 7, 14 และ 21 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสหัวเหลืองในกุ้งทดลองที่ทำการศึกษาทั้งหมดพบว่า กุ้งทุกตัวมีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองแสดงในตารางที่ 9

#### 4.2 การทดสอบการเกิดโรคหัวเหลืองโดยการให้กุ้งขาวแวนนาไมกินพาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

เมื่อนำกลุ่มสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิดได้แก่ กุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยและปูนาที่ทำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยวิธีการฉีดเชื้อหลังจากนั้นเลี้ยงไว้เป็นเวลา 3, 7, 14, 21 และ 28 วันก่อนนำไปสับให้กุ้งขาวแวนนาไมขนาด 8-10 กรัมที่ปลอดเชื้อกินติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน โดยเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมจำนวน 20 ตัว ๆ ละ 10 ตัว (ต่อพาหะหนึ่งชนิด) แบ่งการทดลองเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว หลังจากนั้น 7 วันสังเกตอัตราการตายและทดสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี RT-PCR ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 10 และ 11

ตารางที่ 10 จำนวนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ตายหลังจากกินสัตว์พาหะทั้งสามชนิดที่ติดเชื้อ YHV เป็นเวลา 3 วัน

ชนิดของ สัตว์พาหะที่ ให้กุ้งขาว กิน	จำนวนวัน หลังจากสัตว์ พาหะได้รับ เชื้อ	กลุ่มทดลอง				ค่าเฉลี่ย	ค่า เบี่ยงเบน มาตรฐาน	กลุ่ม ควบคุม
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3				
ปูนา	3	10	10	10	10	0	0	
	7	10	9	10	9.67	0.57	0	
	14	6	6	7	6.33	0.57	0	
	21	2	0	1	1	0	0	
กุ้งก้ามกราม	3	10	10	8	9.33	1.15	0	
	7	5	6	7	6	1	0	
	14	1	2	2	1.67	0.57	0	
	21	1	0	1	0.67	0.57	0	
กุ้งฝอย	3	9	9	10	9.33	0.57	0	
	7	6	9	7	7.33	0.53	0	
	14	1	1	2	1.33	0.57	0	

หมายเหตุ: ปูนาและกุ้งก้ามกรามที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 28 วัน และกุ้งฝอยที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 21 วันสามารถกำจัดเชื้อไวรัสดังกล่าวออกจากตัวได้หมดจากการตรวจการติดเชื้อโดยวิธี RT-PCR จึงไม่ได้นำสัตว์พาหะกลุ่มดังกล่าวมาเลี้ยงร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม

ตารางที่ 11 ผลการตรวจพบเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธี RT-PCR หลังจากกินสัตว์พาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน

ชนิดของสัตว์พาหะที่เลี้ยงรวม	จำนวนวันหลังจากสัตว์พาหะได้รับเชื้อ	กลุ่มทดลอง			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่ากลุ่มควบคุม
		ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3			
ปูนา	3	10	10	10	10	0	0
	7	10	10	10	10	0	0
	14	10	10	10	10	0	0
	21	10	10	10	10	0	0
กุ้งก้ามกราม	3	10	10	10	10	0	0
	7	10	10	10	10	0	0
	14	10	10	10	10	0	0
	21	10	10	10	10	0	0
กุ้งฝอย	3	10	10	10	10	0	0
	7	10	10	10	10	0	0
	14	10	10	10	10	0	0

หมายเหตุ: ปูนาและกุ้งก้ามกรามที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 28 วัน และกุ้งฝอยที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 21 วันสามารถกำจัดเชื้อไวรัสดังกล่าวออกจากตัวได้หมดจากการตรวจการติดเชื้อโดยวิธี RT-PCR จึงไม่นำสัตว์พาหะกลุ่มดังกล่าวมาเลี้ยงร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไม

ผลการศึกษาครั้งนี้ เป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมร่วมกับพาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองคือกุ้งก้ามกรามกุ้งฝอย และปูนาสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ YHV-1b ไปยังกุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการได้โดยกุ้งขาวแวนนาไมที่กินสัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังกุ้งทดลองได้มากที่สุดทำให้กุ้งทดลองในกลุ่มดังกล่าวมีอัตราการตายสูงกว่า กลุ่มอื่น ๆ และอัตราการตายของกุ้งทดลองจะลดลงเรื่อย ๆ ในกลุ่มที่ให้กินสัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลานานขึ้นและ

เมื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยใช้วิธี RT-PCR ในกึ่งทุกตัวที่รอดชีวิตพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งดังกล่าวในทุกกลุ่มการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 ผลการศึกษารึ้นนี้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองของ สัตว์พาหะต่าง ๆ ที่ทำการศึกษาทั้ง กึ่งกำมกราม กึ่งฟอย และปูนา ก่อนนำไปเลี้ยงร่วมกับกึ่งขาวเวนนาไม หรือให้กึ่งกินสัตว์พาหะดังกล่าว มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อไวรัสดังกล่าว สัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลานานก่อนนำไปเลี้ยงร่วมหรือนำไปเป็นอาหารแก่กึ่งทดลองจะมีผลทำให้ความรุนแรงของเชื้อไวรัสดังกล่าวลดลง อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการได้รับเชื้อไวรัสในสัตว์พาหะในการศึกษารึ้นนี้ไม่มีผลต่อความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากพาหะไปยังกึ่งขาวเวนนาไม เพราะกึ่งทุกตัวที่รอดตายพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการตรวจโดยวิธี RT-PCR เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพิจารณา ร่วมกับผลการศึกษาในหัวข้อที่ 3 ซึ่งพบว่าสัตว์พาหะแต่ละชนิดหลังได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองไปแล้วจะสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองดังกล่าวออกจากตัวได้ทำให้สัตว์พาหะแต่ละชนิดมีการติดเชื้อไวรัสลดลงหลังจากเวลาผ่านไประยะหนึ่ง ดังนั้นเมื่อนำพาหะที่มีปริมาณไวรัสลดลงดังกล่าวไปเลี้ยงร่วมหรือให้กึ่งทดลองกินจึงทำให้กึ่งดังกล่าวได้รับไวรัสหัวเหลืองในปริมาณที่ลดลงด้วยจึงทำให้กึ่งในกลุ่มที่เลี้ยงร่วมหรือกินสัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสเป็นเวลานานมีอัตราการตายที่ลดลงเรื่อย ๆ การศึกษารึ้นนี้ยังแสดงให้เห็นว่าไวรัสหัวเหลืองอาจไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในพาหะที่ทำการศึกษา จึงทำให้สัตว์พาหะที่ได้รับเชื้อไวรัสสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ออกจากตัวได้เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง เช่นเดียวกับรายงานของ Lo *et al.*(1996b) ซึ่งรายงานว่าไม่พบการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสดวงขาวในพาหะบางชนิดที่ติดเชื้อไวรัสดังกล่าว แสดงว่าเชื้อไวรัสแต่ละชนิดล้วนมีความจำเพาะต่อเจ้าบ้านสูงมาก การตรวจพบการปนเปื้อนของไวรัสใน พาหะแต่ละชนิด ไม่สามารถ ระบุได้ว่าเกิดการ ถ่ายทอดเชื้อ ไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ เพราะเชื้อไวรัสดังกล่าวอาจไม่สามารถจำลองตัวได้ภายในพาหะเหล่านั้น (Flint *et al.*,2004 ; Chuchird, 2002) อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดไปยังเจ้าบ้านที่เหมาะสมได้ เห็นได้จากรายผลการติดเชื้อไวรัสในกึ่งขาวเวนนาไมจากการศึกษารึ้นนี้

##### 5. การศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งขาวเวนนาไมจากการฉีดเชื้อไวรัสและการให้กึ่งปกติกินกึ่งที่ป่วยแล้วนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน

ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 12 และ 13 ภาพที่ 14, 15 และ 16 พบว่ากึ่งที่ติดเชื้อไวรัสแสดงอาการส่วนหัวมีสีเหลือง ก่อนข้างชัด สำหรับอัตราการตายของกึ่งพบได้ตั้งแต่ 1 วันหลังจากฉีดเชื้อไวรัส โดยกึ่งที่ติดเชื้อจะตายสูงสุดในช่วง 1-3 วันหลังจากได้รับเชื้อไวรัส กึ่งทดลองในกลุ่ม

ที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 5 พีพีที จะพบอัตราการตายสูงที่สุดและตายเร็วที่สุดในขณะที่กึ่งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 30 พีพีที จะตายช้าที่สุดโดยสามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึงประมาณ 20 วัน การทดลองต่อมาจึงเปลี่ยนวิธีการให้เชื้อไวรัสจากการฉีดเชื้อไวรัสเข้าไปในกึ่งเป็นการให้กึ่งได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการกินกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองแล้วนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน เช่นเดียวกับการทดลอง ครั้งแรก พบว่ากึ่งที่ติดเชื้อไวรัสเริ่มตายในวันที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อไวรัส โดยกึ่งในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 5 พีพีทีจะพบอัตราการตายสูงที่สุดและตายเร็วที่สุดในขณะที่กึ่งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 30 พีพีที จะตายช้าที่สุดโดยสามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 40 วัน สำหรับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในการศึกษาครั้งนี้พบลักษณะ nuclear pyknosis และ karyorrhexis ในเหงือก ต่อมน้ำเหลือง ต. ลอดจน ดับและดับอ่อน และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissue) ของกึ่ง สำหรับการศึกษาโดยใช้วิธี RT-PCR พบว่ากึ่งทดลองทุกตัวที่ติดเชื้อให้ผลบวกกับชุดตรวจสอบที่นำมาศึกษา ในขณะที่กึ่งในกลุ่มควบคุมบางตัวที่ตายให้ผลลบกับการติดเชื้อไวรัสจากการตรวจสอบโดยวิธี RT-PCR การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าระดับความเค็มของน้ำที่เลี้ยงมีผลต่อความรุนแรงของโรคไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์นี้โดยกึ่งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำ 5 พีพีที มีอัตราการตายสูงที่สุดและตายเร็วที่สุดเมื่อ เปรียบเทียบกับกึ่งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 15 และ 30 พีพีที ในขณะที่กึ่งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มปกติคือ 30 พีพีที จะมีอัตราการตายช้าที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับสภาพปัจจุบันที่เรา จะไม่พบการตายของกึ่ง ขาวแวนนาไม ด้วยโรคไวรัสหัวเหลือง บริเวณที่มีการเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มปกติในพื้นที่ชายฝั่งทะเล

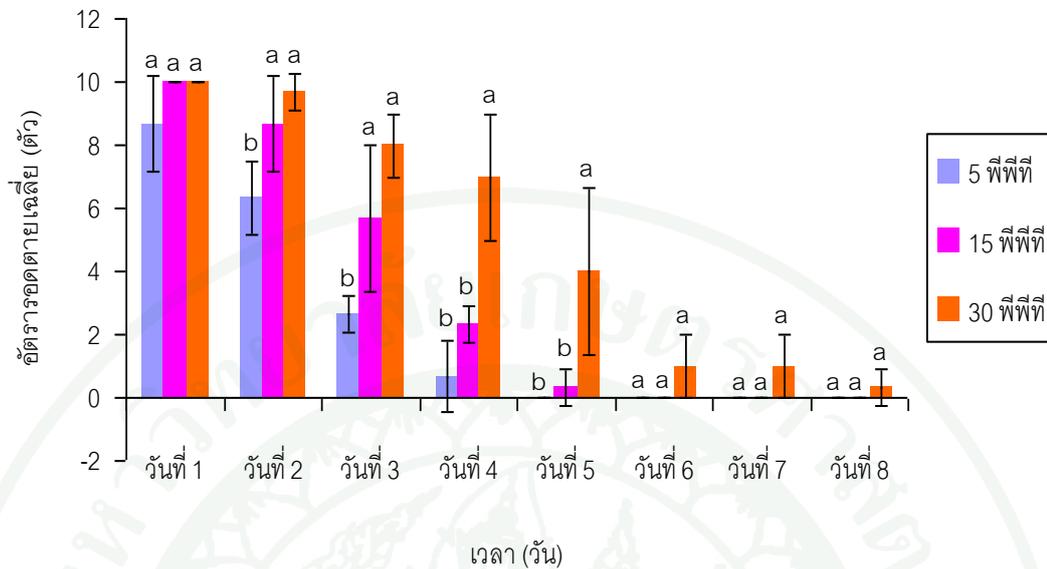


ภาพที่ 14 กุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (บน) จะพบบริเวณส่วนหัวมีสีเหลืองชัดเจน  
เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ (ล่าง)

ตารางที่ 12 อัตรารอดตายเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเค็มต่าง ๆ หลังฉีดเชื้อ YHV

เวลา (วันหลังจากได้รับเชื้อไวรัส)	กลุ่มความเค็ม		
	5 พีพีที	15 พีพีที	30 พีพีที
วันที่ 1	8.67±1.53 <sup>a</sup>	10±0 <sup>a</sup>	10±0 <sup>a</sup>
วันที่ 2	6.33±1.15 <sup>b</sup>	8.67±1.53 <sup>a</sup>	9.67±0.58 <sup>a</sup>
วันที่ 3	2.67±0.58 <sup>b</sup>	5.67±2.31 <sup>a</sup>	8±1 <sup>a</sup>
วันที่ 4	0.67±1.15 <sup>b</sup>	2.33±0.58 <sup>b</sup>	7±2 <sup>a</sup>
วันที่ 5	0±0 <sup>b</sup>	0.33±0.58 <sup>b</sup>	4±2.65 <sup>a</sup>
วันที่ 6	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	1±1 <sup>a</sup>
วันที่ 7	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	1±1 <sup>a</sup>
วันที่ 8	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.33±0.58 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )



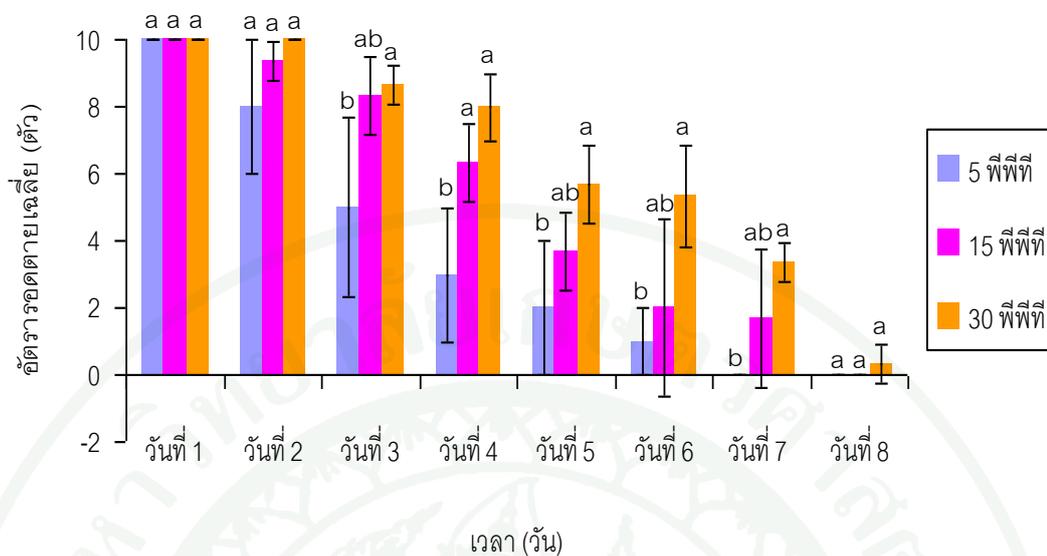
ภาพที่ 15 อัตรารอดตายเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเค็มต่าง ๆ หลังฉีดเชื้อ YHV

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสเป็นระยะเวลา 8 วัน (ตารางที่ 12 และ ภาพที่ 15) พบว่าอัตราการรอดตายเฉลี่ยในวันที่สองของการทดลอง กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 5 พีพีที มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเท่ากับ  $6.33 \pm 1.15$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับกลุ่มการทดลองที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 15 และ 30 พีพีที ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเฉลี่ยเท่ากับ  $8.67 \pm 1.53$  เปอร์เซ็นต์ และ  $9.67 \pm 0.58$  เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 5, 15 และ 30 พีพีทีพบว่า กุ้งขาวในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 5 พีพีที มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยลดลงเร็วที่สุด โดยมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเท่ากับ  $0 \pm 0$  เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 5 หลังจากฉีดเชื้อไวรัส ส่วนกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 15 พีพีที มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเท่ากับ  $0 \pm 0$  เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 6 หลังจากฉีดเชื้อไวรัส ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 30 พีพีทีมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยสูงที่สุด เมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 วัน พบว่าอัตราการรอดตายเฉลี่ยของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำที่มีความเค็ม 5, 15 และ 30 พีพีที มีค่าเท่ากับ  $0 \pm 0$ ,  $0 \pm 0$  และ  $0.33 \pm 0.58$  ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

ตารางที่ 13 อัตรารอดตายเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเค็มต่าง ๆ หลังให้กินกุ้งที่มีเชื้อ YHV

เวลา (วันหลังจากได้รับเชื้อไวรัส)	กลุ่มความเค็ม		
	5 พีพีที	15 พีพีที	30 พีพีที
วันที่ 1	10±0 <sup>a</sup>	10±0 <sup>a</sup>	10±0 <sup>a</sup>
วันที่ 2	8±2 <sup>a</sup>	9.33±0.58 <sup>a</sup>	10±0 <sup>a</sup>
วันที่ 3	5±2.65 <sup>b</sup>	8.33±1.15 <sup>ab</sup>	8.67±0.58 <sup>a</sup>
วันที่ 4	3±2 <sup>b</sup>	6.33±1.15 <sup>a</sup>	8±1 <sup>a</sup>
วันที่ 5	2±2 <sup>b</sup>	3.67±1.15 <sup>ab</sup>	5.67±1.15 <sup>a</sup>
วันที่ 6	1±1 <sup>b</sup>	2±2.65 <sup>ab</sup>	5.33±1.53 <sup>a</sup>
วันที่ 7	0±0 <sup>b</sup>	1.67±2.08 <sup>ab</sup>	3.33±0.58 <sup>a</sup>
วันที่ 8	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.33±0.58 <sup>a</sup>

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ )



ภาพที่ 16 อัตรารอดตายเฉลี่ยกุ้งขาวแวนนาไมที่ระดับความเค็มต่าง ๆ หลังให้กินกุ้งที่มีเชื้อ YHV

หลังจากเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้การให้เชื้อไวรัสโดยการกินเป็นระยะเวลา 8 วัน (ตารางที่ 13 และ ภาพที่ 16) พบว่าอัตราการรอดตายเฉลี่ยในวันที่สามของการทดลอง กุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 5 พีพีที มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเท่ากับ  $5 \pm 2.65$  เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับกลุ่มการทดลองที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 30 พีพีที ซึ่งมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเท่ากับ  $8.67 \pm 0.58$  เปอร์เซ็นต์ และ  $9.67 \pm 0.58$  แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) กับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 15 พีพีที เมื่อเปรียบเทียบกุ้งขาวที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 5, 15 และ 30 พีพีทีพบว่า กุ้งขาวในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 5 พีพีที มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยลดลงเร็วที่สุด โดยมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเท่ากับ  $0 \pm 0$  เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 7 หลังจากให้กินเชื้อไวรัส ส่วนกุ้งที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 15 พีพีที มีอัตราการรอดตายเฉลี่ยเท่ากับ  $0 \pm 0$  เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 8 หลังจากให้กินเชื้อไวรัส ในขณะที่กุ้งที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็ม 30 พีพีทีมีอัตราการรอดตายเฉลี่ยสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการทดลองหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 วัน พบว่าอัตราการรอดตายเฉลี่ยของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยน้ำที่มีความเค็ม 5, 15 และ 30 พีพีที มีค่าเท่ากับ  $0 \pm 0$ ,  $0 \pm 0$  และ  $0.33 \pm 0.58$  ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

## 6. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

เมื่อนำกุ้งขาวแวนนาไมที่ป่วย แต่ยังมีชีวิตอยู่มาศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบการเปลี่ยนแปลงในอวัยวะต่าง ๆ ดังนี้

### 6.1 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

#### 6.1.1 ต่อม้ำเหลือง (Lymphoid organ)

เป็นอวัยวะที่ตั้งอยู่ได้กระเพาะอาหารส่วนหน้า อยู่บริเวณด้านหน้าก่อนมาทางด้านใต้ของตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อปกติจะมีลักษณะเป็นท่อ ประกอบด้วยเซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยภายในท่อจะมีเส้นเลือดอยู่และบริเวณรอบ ๆ ท่อจะมีแอ่งเลือด (hemal space) จากการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ กุ้งขาวที่เป็นโรคหัวเหลืองในการทดลองนี้ พบการตายของเซลล์ในต่อม้ำเหลืองมีลักษณะนิวเคลียสหดตัวเล็กลง (nucleus pyknosis) และโครมาตินจะรวมตัวเป็นก้อน หรือพบนิวเคลียสเกิดการแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (karyorrhexis) กระจายอยู่ทั่วไปในไซโทพลาสซึม อย่างเด่นชัด (ภาพที่ 17-19)

#### 6.1.2 เนื้อเยื่อบริเวณเหงือก (Gill tissue)

เนื้อเยื่อปกติของเหงือกประกอบด้วยชั้นของเนื้อเยื่อผิวที่มีลักษณะเป็นเยื่อบาง ๆ ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงและค้ำจุนเหงือก มีช่องว่างขนาดเล็กคือแอ่งเลือดแทรกอยู่เพื่อให้น้ำเลือดและเม็ดเลือดไหลผ่านได้ สำหรับ ลักษณะพยาธิสภาพ ของเนื้อเยื่อที่ เป็นโรคหัวเหลือง ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรียใดๆ แต่พบการบวมน้ำในเซลล์เยื่อผิว และพบลักษณะก้อนกลม ๆ ติดสี น้ำเงินเข้ม อยู่ภายในไซโทพลาสซึมคล้ายกับอินคลูชันบอดี้ ซึ่งเรียกลักษณะดังกล่าวว่า basophilic cytoplasmic inclusion ในเซลล์เยื่อผิวและเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งป่วย นอกจากนี้ยังพบการตายของเซลล์เยื่อผิว และเซลล์ของเม็ดเลือด มีลักษณะ pyknotic nucleus และนิวเคลียสในเซลล์แตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (karyorrhexis) อย่างชัดเจน (ภาพที่ 20-22)

6.1.3 เนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อน (Hepatopancreas tissue) และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue)

เนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อนของกุ้งปวย พบว่ามีการสะสมไขมันในปริมาณน้อยในเซลล์เยื่อบุชนิด R-cell และมีการตายของเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ภายในแองเลือด และเนื้อเยื่อที่แทรกอยู่ระหว่างท่อตับและตับอ่อน (interstitial cell) รวมถึงในอวัยวะสร้างเม็ดเลือดโดย เม็ดเลือดที่ตายมีลักษณะ pyknosis และ karyorrhexis (ภาพที่ 23-26)

6.1.4 เนื้อเยื่อบริเวณชั้นใต้เปลือก (Subcuticular epithelium)

พบการตายและการเสื่อมของเซลล์เนื้อเยื่อชั้น epidermis และเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกุ้งที่ติดเชื้อ บางเซลล์มีลักษณะของการเกิด karyorrhexis (ภาพที่ 27)

6.1.5 เนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อและกล้ามเนื้อหัวใจ (Muscular and myocardium tissue)

ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจของกุ้งที่ติดเชื้อ พบการตายของเซลล์เม็ดเลือดที่แทรกอยู่บริเวณกล้ามเนื้อหัวใจพบลักษณะของ nucleus pyknosis และพบการตายเป็นแห่ง ๆ ของเนื้อเยื่อบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจ (focal necrosis) (ภาพที่ 28-30)

6.2 การศึกษาเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry

การศึกษาคัดเชื้อ YHV ในเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งขาวด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าสามารถสังเกตได้ชัดเจนมากกว่าการย้อมด้วยสี H&E ซึ่งในกุ้งขาวสามารถพบความผิดปกติของพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ได้ชัดเจนในต่อมน้ำเหลือง , เหงือก และเนื้อเยื่อที่แทรกอยู่ระหว่างท่อตับและตับอ่อน โดยจะพบลักษณะของ pyknotic nuclei และ karyorrhexis ในเนื้อเยื่อดังกล่าว (ภาพที่ 17, 20 และ 23) ส่วนการทดสอบด้วย immunohistochemistry สามารถพบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อบริเวณอื่น ๆ ของกุ้งขาว เช่น เนื้อเยื่อบริเวณชั้นใต้เปลือก , กล้ามเนื้อ , หัวใจ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ภาพที่ 27B, 28B, 30B และ 31B) โดยเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัส YHV จะติดสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 32B, 33B, 34B และ 35B) ซึ่งเกิดจากการใช้ antibody ที่มีความจำเพาะสำหรับ antigen แต่ละชนิดเป็นตัวจับ ซึ่งการตรวจสอบกับไวรัสหัวเหลือง ในการศึกษาคั้งนี้ จะใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่

จำเพาะต่อ YHV ตามที่ระบุไว้ในรายงานของ (Sithigorngul *et al.* , 2002) ซึ่งสามารถใช้เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสทั้งชนิด YHV-1a และ YHV-1b ที่พบในประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

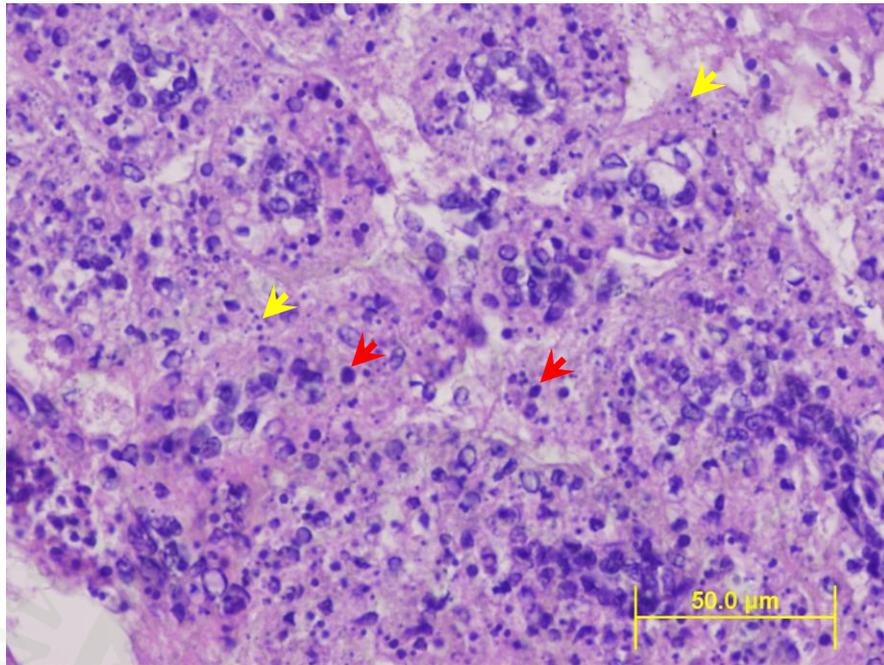
## 7. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของสัตว์พาหะที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง

สำหรับพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ สัตว์พาหะที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ ปูนา กุ้งฝอย และกุ้งก้ามกรามเมื่อข้อมด้วยH&E แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบความผิดปกติในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์พาหะดังกล่าวแต่อย่างใด(ภาพที่ 32A, 33A, 34A และ 35A) แต่เมื่อนำมาตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยใช้เทคนิคimmunohistochemistry พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในบางอวัยวะแตกต่างกัน โดยปูนา จะพบติดสีเข้มชัดเจนของโมโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่บริเวณเหงือก (ภาพที่ 32B, 33B) สำหรับในกุ้งก้ามกรามพบ การติดเชื้อไวรัสใน เนื้อเยื่อบริเวณตับและตับอ่อน (ภาพที่ 34B) ส่วนในกุ้งฝอย พบการติดเชื้อไวรัสชัดเจนบริเวณเหงือก (ภาพที่ 35B) ผลการศึกษานี้แสดงว่าในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในพาหะชนิดต่าง ๆ นั้น นอกจากวิธี RT-PCR แล้วการใช้ immunohistochemistry โดยใช้ โมโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ให้ผลแม่นยำในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวในสัตว์พาหะ ในขณะที่ การตรวจสอบโดยใช้การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อนั้นไม่เหมาะสมเพราะไม่สามารถพบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ของสัตว์พาหะที่ติดเชื้อ

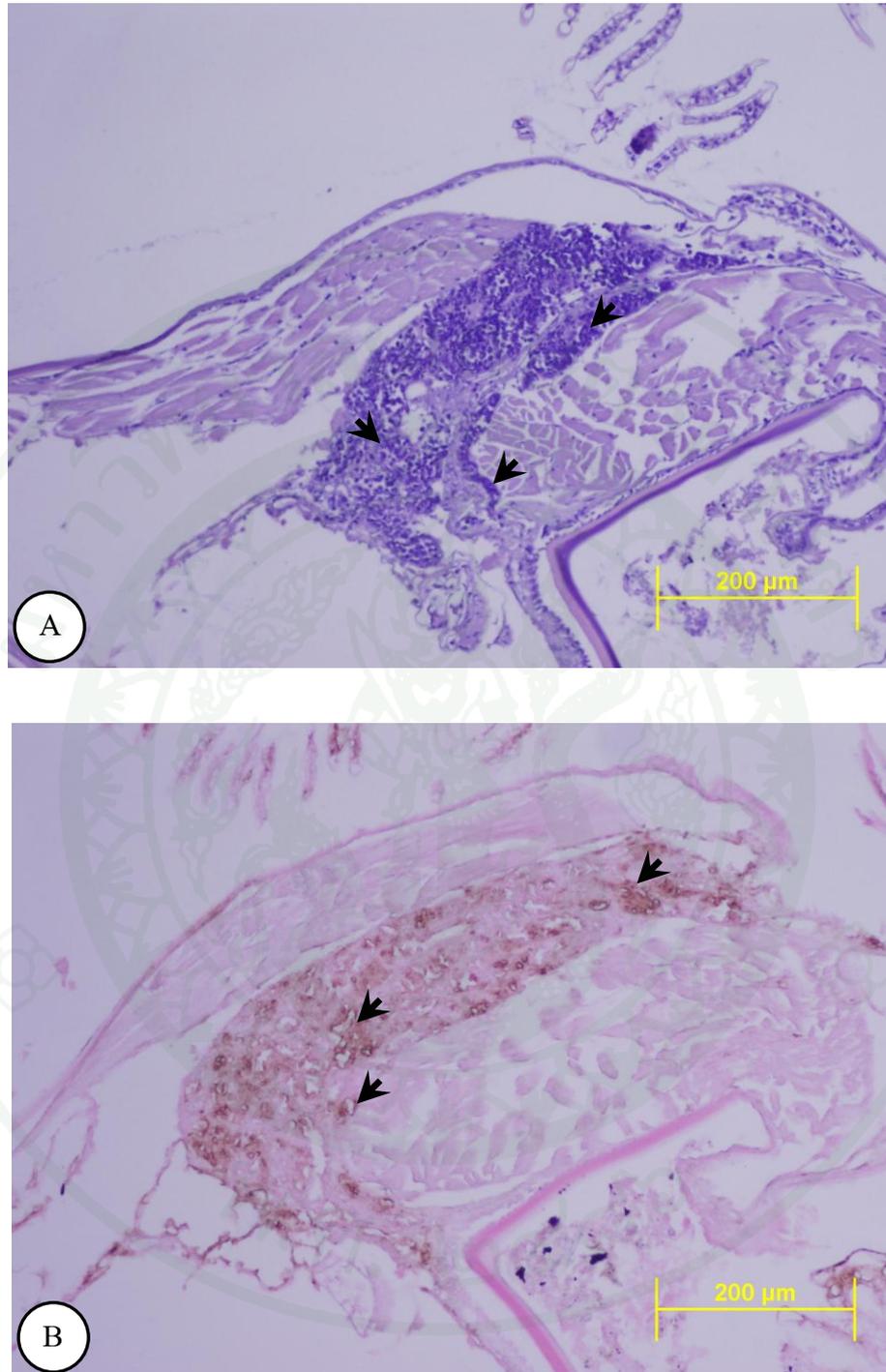
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในครั้งนี้ พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Chantanachookin *et al.*(1993) และ Lu *et al.*(1994) ซึ่งรายงานการพบการตายของเซลล์เม็ดเลือดในลักษณะ nucleus pyknosis และ karyorrhexis ในบริเวณเหงือก และต่อมน้ำเหลืองของกุ้ง นอกจากนี้ยังพบการตายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆ ได้เช่น ผิวอิพิเคอร์มิส กล้ามเนื้อหัวใจ ตลอดจน ผนังหรือเยื่อบุตับและตับอ่อน สอดคล้อง กับรายงานของ (สิทธิ และคณะ , 2535) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเกิด nuclear spheroid ในเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของกุ้งที่ติดเชื้อ ตามรายงานของ Flegel and Sriurairatana (1993 ) และ (ปิยนุช, 2550)

สำหรับผลการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อสัตว์พาหะได้ แก่กุ้งก้ามกราม กุ้งฝอย และปูนาที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ไม่พบความผิดปกติ ทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์พาหะที่ทำการศึกษาอย่างไรก็ตาม การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยใช้เทคนิคทาง immunohistochemistry แสดงให้เห็นว่าสัตว์พาหะดังกล่าวสามารถยอมรับการ

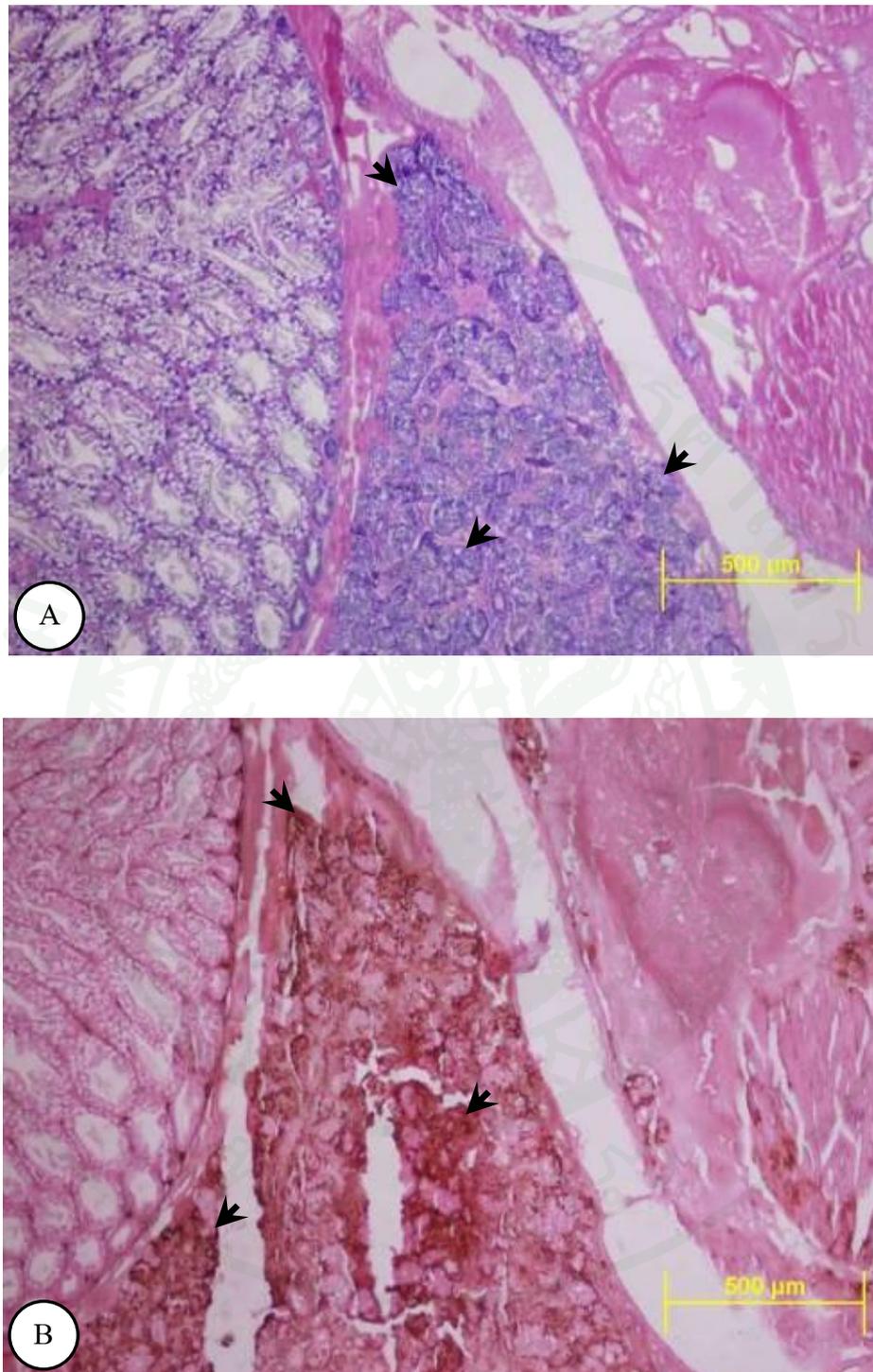
ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ดังจะเห็นได้จากการพบไวรัสหัวเหลืองในบางอวัยวะของสัตว์พาหะที่ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค immunohistochemistry กับ โมโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (Sithigorngul *et al.* , 2002) แต่ไวรัสหัวเหลืองไม่สามารถทำอันตรายใด ๆ แก่สัตว์พาหะดังกล่าวเห็นได้จากการไม่พบการตายของสัตว์พาหะทุกตัวที่ทำการศึกษาและจาก ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ สัตว์พาหะหลังจากการย้อมด้วยสี H&E แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ซึ่งไม่พบความผิดปกติใดๆเลยในเนื้อเยื่อของสัตว์พาหะที่ทำการศึกษา ผลการศึกษาค้นครั้งนี้จึงยืนยันสมมติฐานที่ว่า เชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ YHV-1b นั้นไม่สามารถจำลองตัวเองหรือเพิ่มจำนวนได้ในสัตว์พาหะได้แก่กึ่งก้ามกราม กุ้งฝอยและปูนาที่ใช้ในการศึกษาค้นครั้งนี้ และสัตว์พาหะดังกล่าวสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองออกจากร่างกายได้หลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองไปแล้วระยะเวลาหนึ่ง โดยระยะเวลาในการกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองออกจากตัวของสัตว์พาหะแต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันขึ้นกับปริมาณของเชื้อไวรัสในตัวสัตว์พาหะและความแข็งแรงของสัตว์พาหะแต่ละตัว จากการศึกษาค้นครั้งนี้พบว่ากึ่งก้ามกรามและปูนาที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองจะสามารถกำจัดเชื้อไวรัสออกจากตัวได้ หมดภายในเวลา 28 วัน ในขณะที่กุ้งฝอยสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ หมดภายในเวลา 21 วัน ดังนั้นเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งในพื้นที่ความเค็มต่ำที่ พบการระบาดของโรคหัวเหลืองและมีสัตว์พาหะดังกล่าวอาศัยอยู่จะต้องป้องกันไม่ให้สัตว์พาหะดังกล่าวเข้ามาในพื้นที่เลี้ยง โดยการทำรั้วกันปูและกรองน้ำด้วยวนสีฟ้า 2 ชั้นขนาด 26 ตา ก่อนจะที่สูบน้ำเข้ามาในบ่อเลี้ยง เกษตรกรควรมีบ่อพักน้ำและพักน้ำในบ่อเป็นเวลาอย่างน้อย 28 วันก่อนนำมาใช้ในการเลี้ยงวิธีการดังกล่าว จะสามารถป้องกันการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมได้ Flegel (2007) รายงานว่าสัตว์กลุ่มกึ่งและปูสามารถติดเชื้อไวรัสหรือเป็นพาหะเชื้อไวรัสได้หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด โดยบางครั้งพบว่าสัตว์พาหะ บางชนิดมีลักษณะการติดเชื้อไวรัสแบบไม่แสดงอาการ ได้ในระยะยาวซึ่งอาจยาวถึงชั่วอายุของสัตว์นั้นแต่ไวรัสดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดเชื้อไปยังสัตว์ประเภทกึ่งและปูชนิดอื่นๆได้ ดังนั้นควรมีการระมัดระวังในการเคลื่อนย้ายสัตว์พวกกึ่งและปูไปเลี้ยงในบริเวณที่ไม่เคยมีการเพาะเลี้ยงมาก่อน เพื่อหลีกเลี่ยงความเสี่ยงจากเชื้อโรคที่ติดมากับสัตว์ดังกล่าว นอกจากนี้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งควรพิจารณาใช้ลูกพันธุ์กุ้งที่ปลอดเชื้อไวรัสในการเลี้ยง และควรมีการใช้ระบบการรักษาความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosecurity system) ที่เหมาะสมภายในฟาร์ม เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคไวรัสระบาดภายในฟาร์มเลี้ยงกุ้งของเกษตรกรด้วย



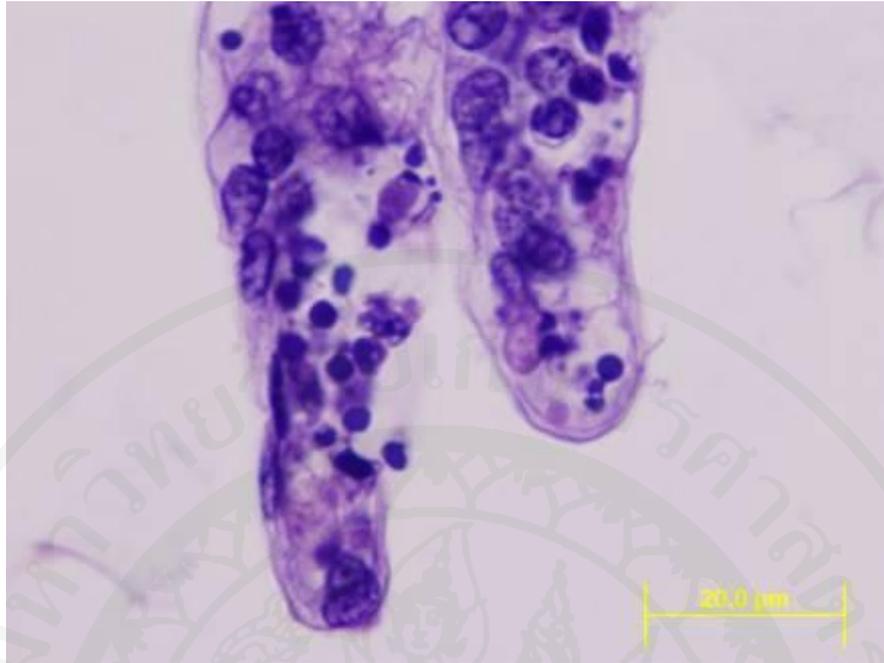
ภาพที่ 17 พยาธิสภาพ lymphoid organ ของกึ่งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ YHV ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย น้ำความเค็มต่ำ พบ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้สีแดง) และ karyorrhexis (ลูกศรชี้สีเหลือง) ของเซลล์จำนวนมาก (H&E, bar = 50.0 μm)



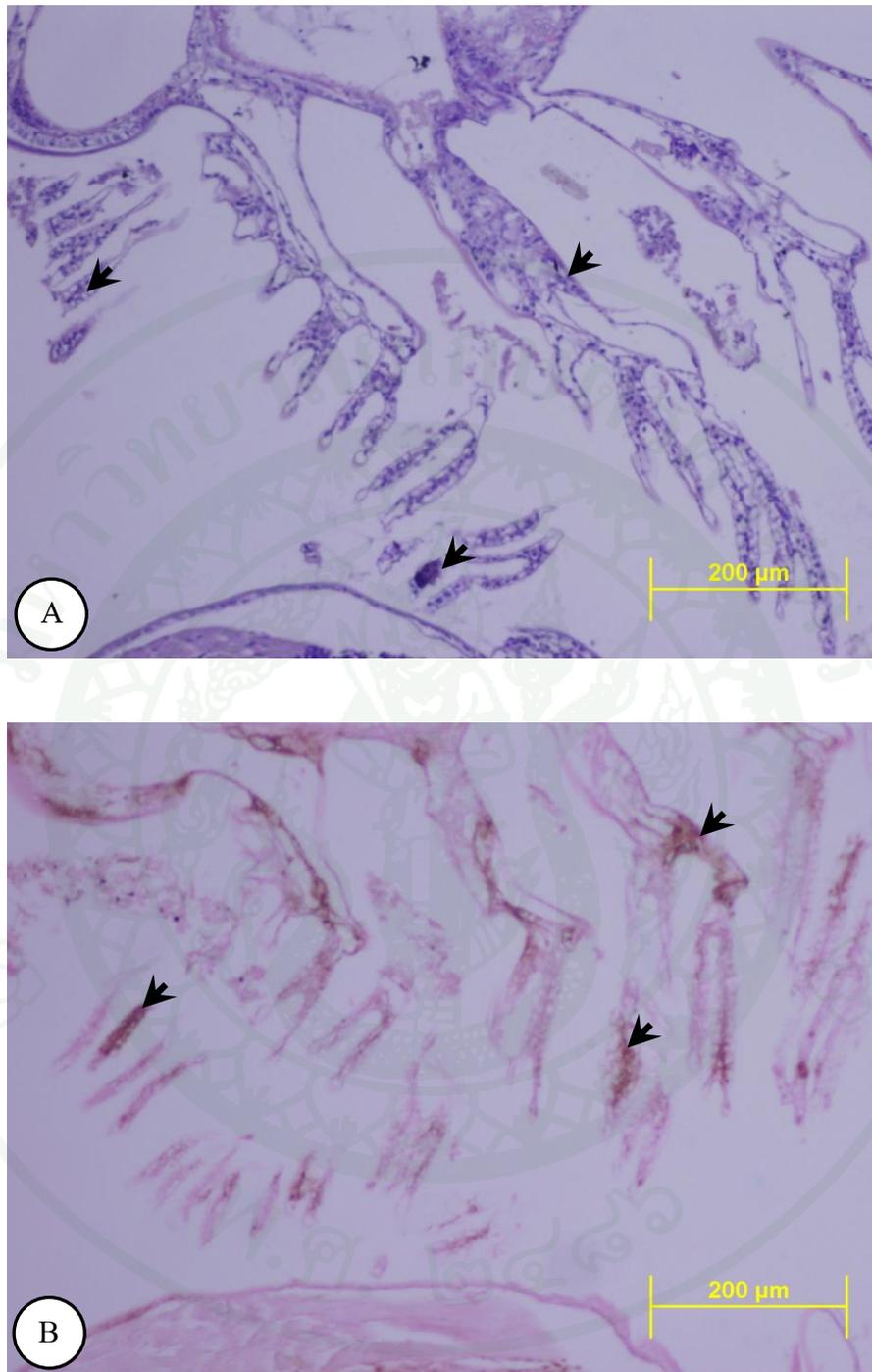
**ภาพที่ 18** การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (18A) พบเซลล์บริเวณ lymphoid organ ของกุ้งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) (bar = 200μm) เปรียบเทียบกับ การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunihistochemistry (18B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสี น้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีY19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200μm)



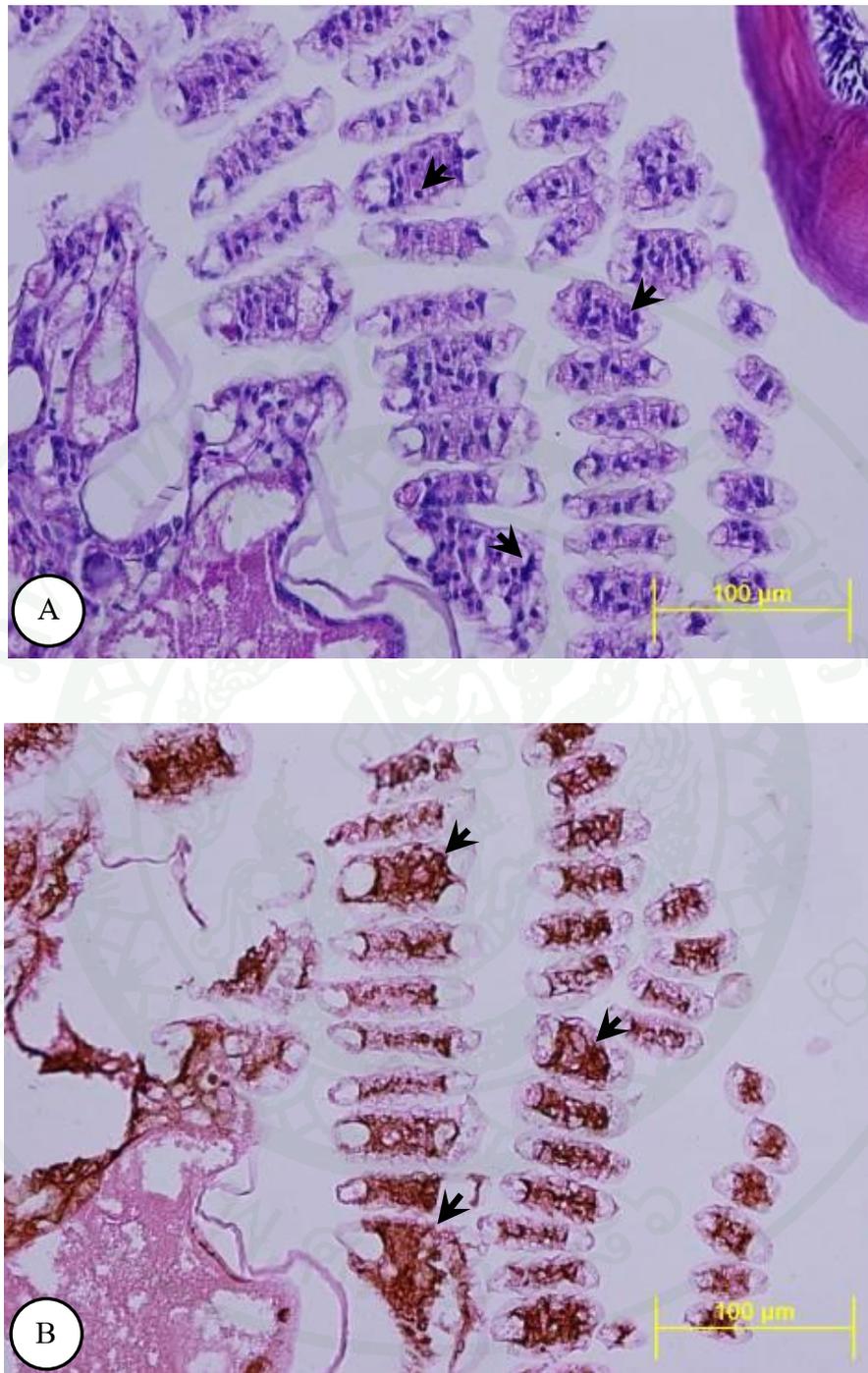
**ภาพที่ 19** การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (19A) พบเซลล์บริเวณ lymphoid organ ของกึ่งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei แทรกอยู่จำนวนมาก (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (19B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 500µm)



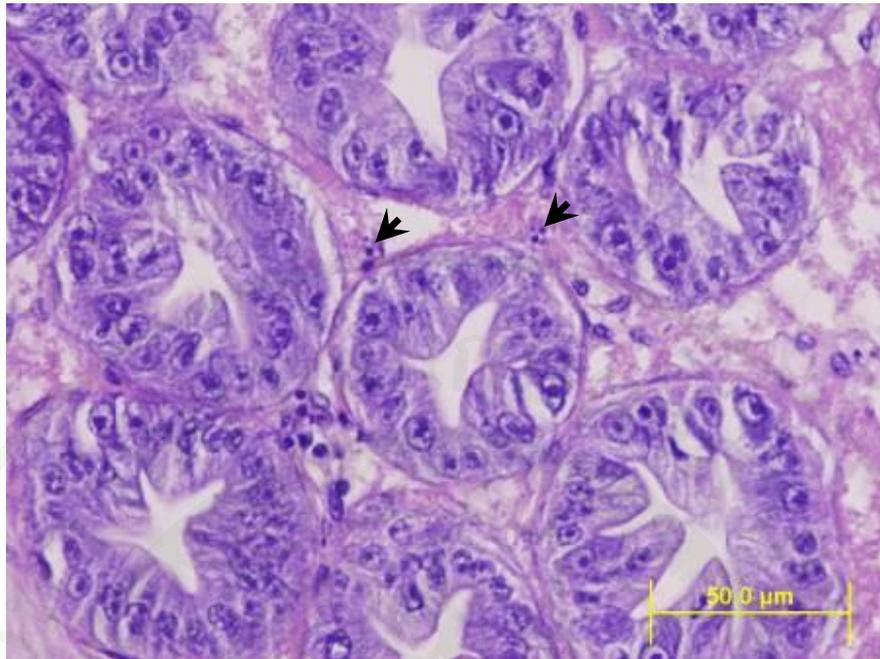
ภาพที่ 20 พยาธิสภาพของเหงือกกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ YHV ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ พบการบวมน้ำและพบ basophilic cytoplasmic inclusion ตัดสีน้ำเงินจากการย้อมด้วยสี (H&E, bar = 20.0μm)



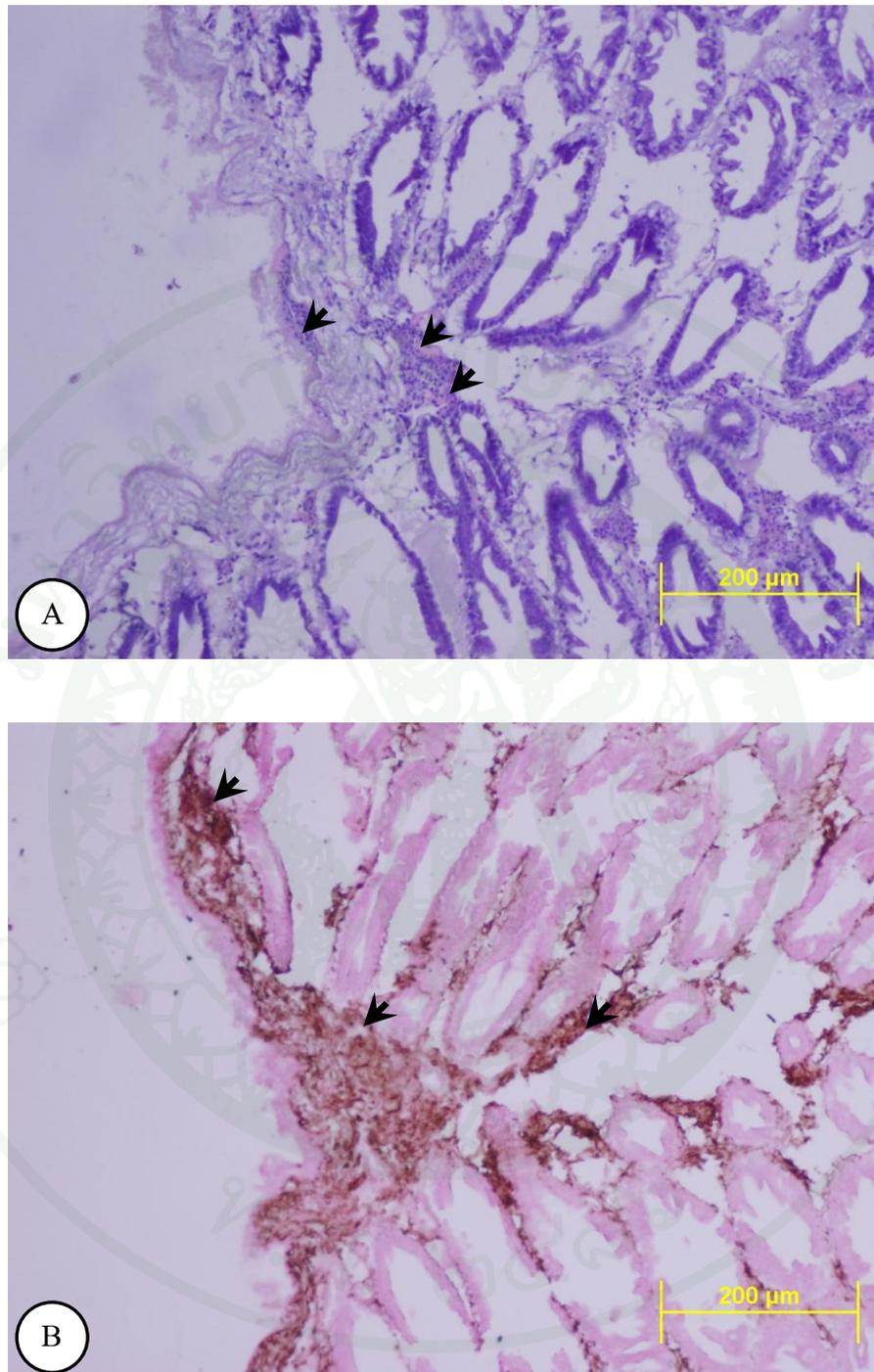
ภาพที่ 21 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (21A) พบเซลล์บริเวณเหงือกถุงขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (21B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200μm)



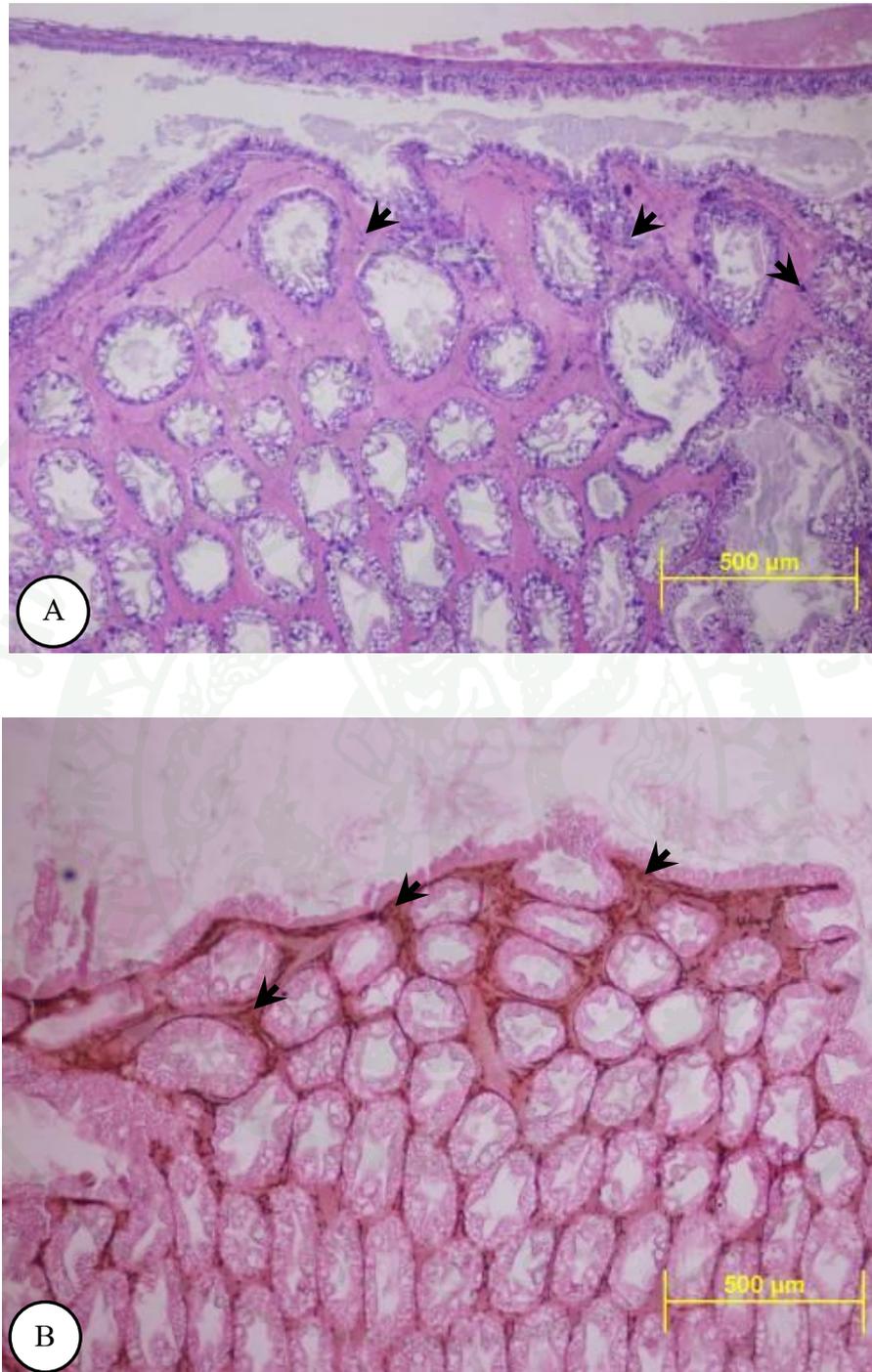
**ภาพที่ 22** การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (22A) พบลักษณะ basophilic cytoplasmic inclusion ติดสีน้ำเงินเข้มในเซลล์ผิวหนังกและเซลล์เม็ดเลือดของรกซึ่งขาวที่ ติดเชื้อไวรัสหัดเหลือง(ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (22B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของ โมโนโคลนอล แอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 100μm)



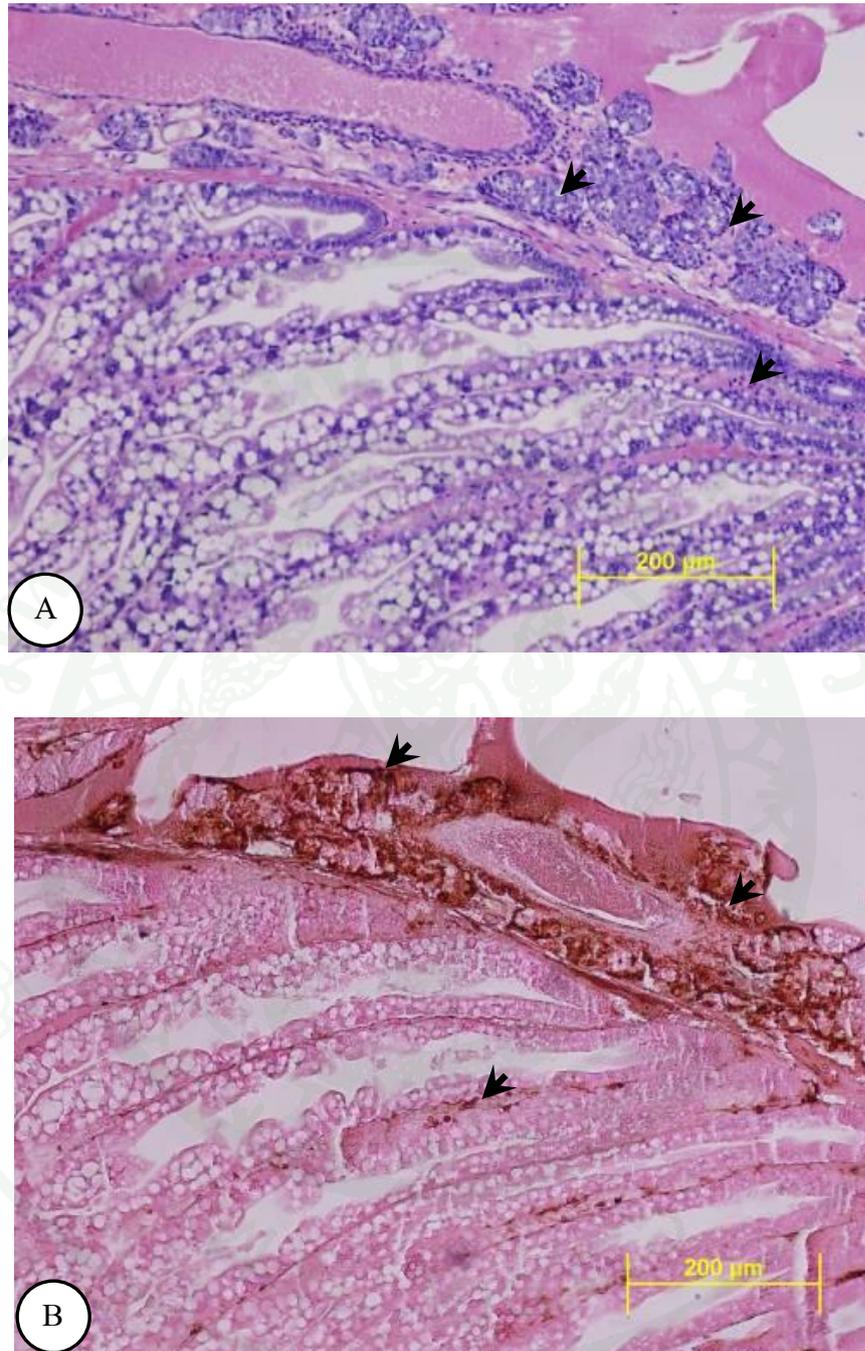
ภาพที่ 23 พยาธิสภาพของตับและตับอ่อนกึ่งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ YHV ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ พบ pyknotic nuclei ที่ interstitial cells จำนวนมาก (ลูกศรชี้) (H&E, bar = 50.0μm)



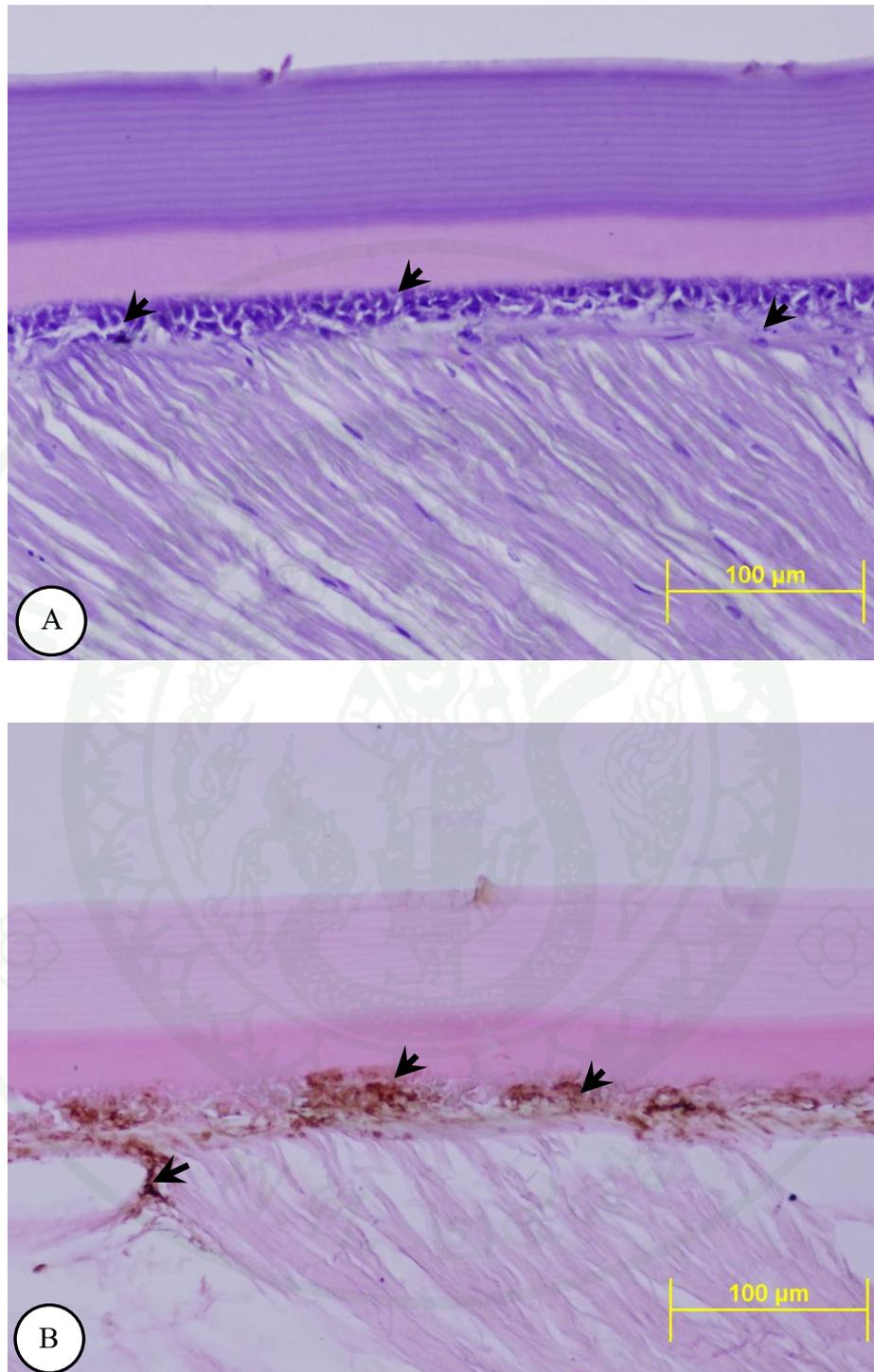
**ภาพที่ 24** การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (24A) พบเซลล์บริเวณ interstitial cells ของตับและตับอ่อนกุ้งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei จำนวนมาก (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (24B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีY19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200μm)



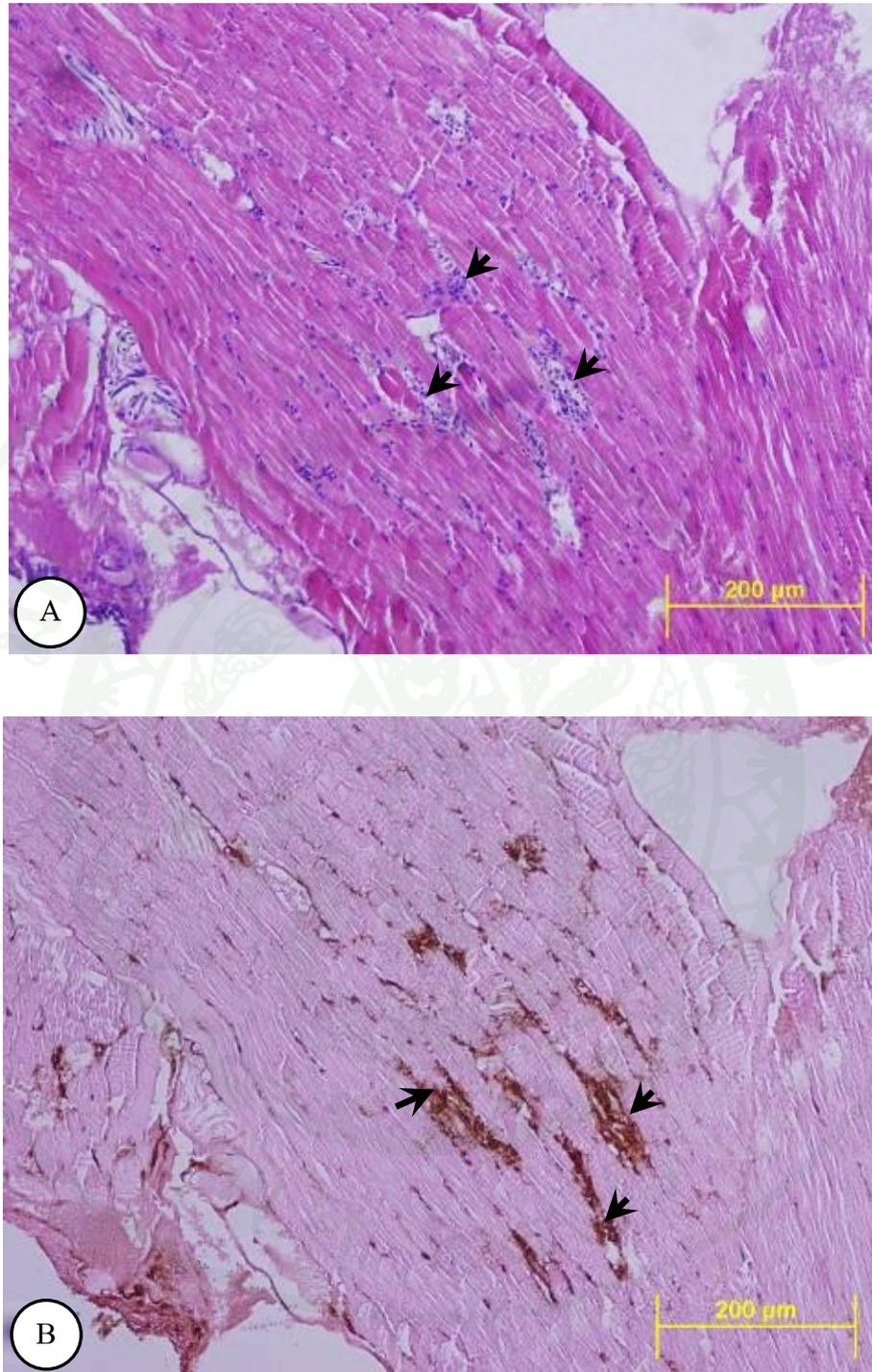
ภาพที่ 25 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (25A) พบลักษณะ pyknotic nuclei ในเนื้อเยื่อบริเวณ interstitial cells ของอัณฑะและอัณฑะอ่อนกึ่งขาวที่ติดเชื้อ (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (25B) พบการติดเชื้อ YHV ซึ่งติดสีน้ำตาลของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV ในบริเวณดังกล่าว (ลูกศรชี้) (bar = 500 $\mu$ m)



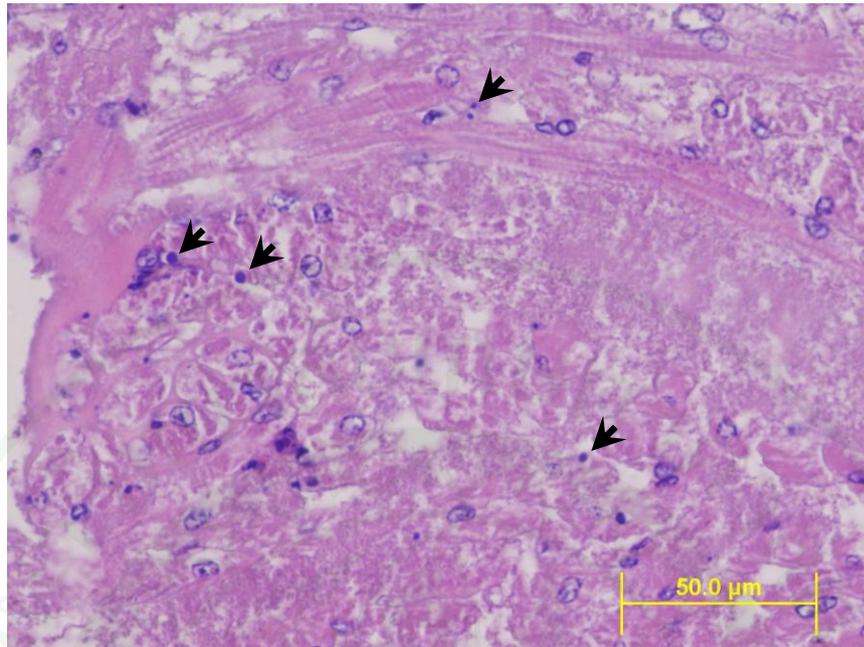
**ภาพที่ 26** แสดงการตายของเซลล์เม็ดเลือดมีลักษณะ pyknotic nuclei และ karyorrhexis (ลูกศรชี้) บริเวณ interstitial cells ของ ตับและตับอ่อนและในอวัยวะสร้างเม็ดเลือดของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ YHV (H&E) (26A) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (26B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200 μm)



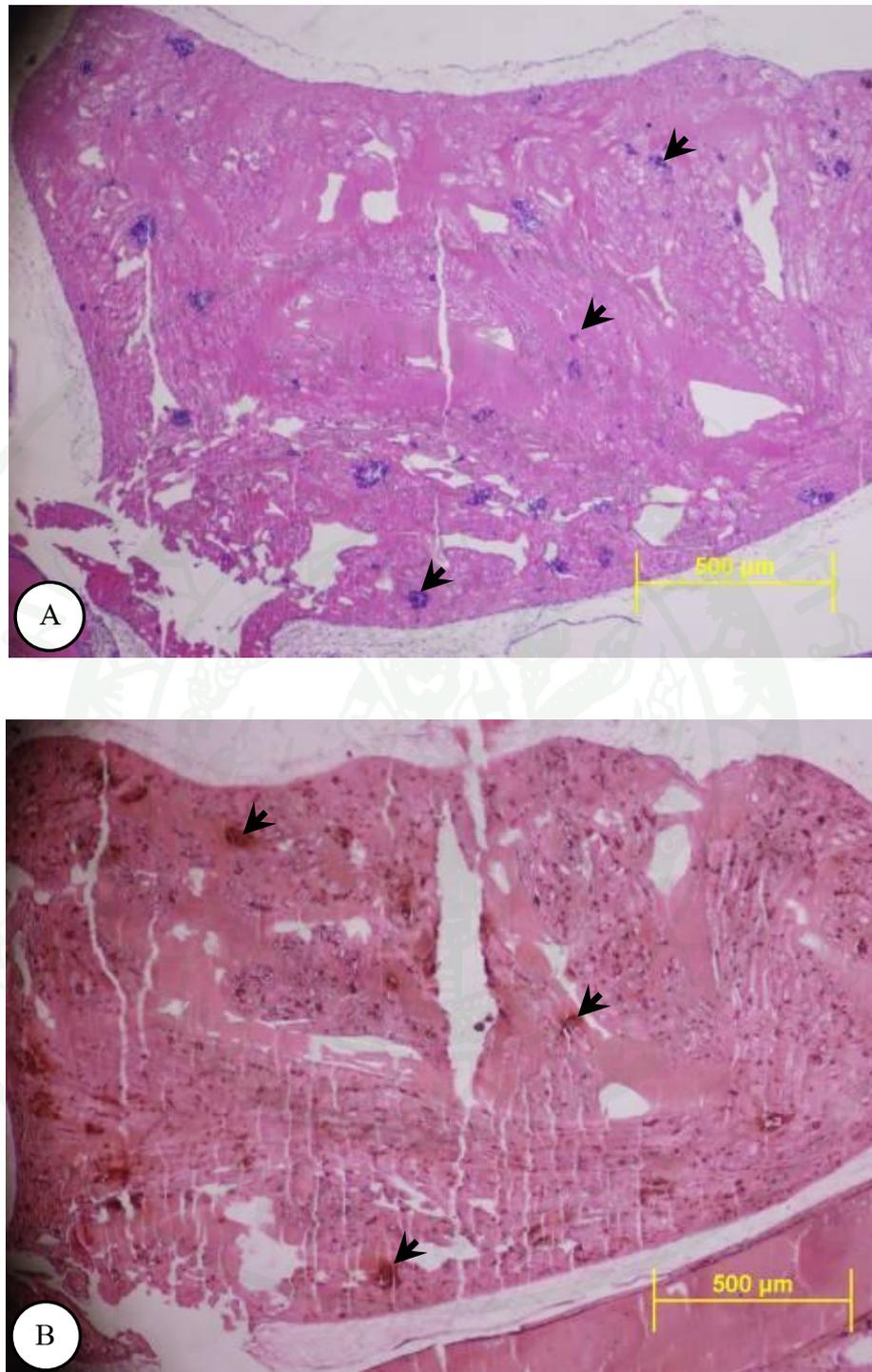
ภาพที่ 27 แสดงการตายของเซลล์ epidermis และการเสื่อมของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน บริเวณชั้นใต้เปลือกของกุ้งขาวที่ติดเชื้อ (H&E) (27A) (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (27B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 100μm)



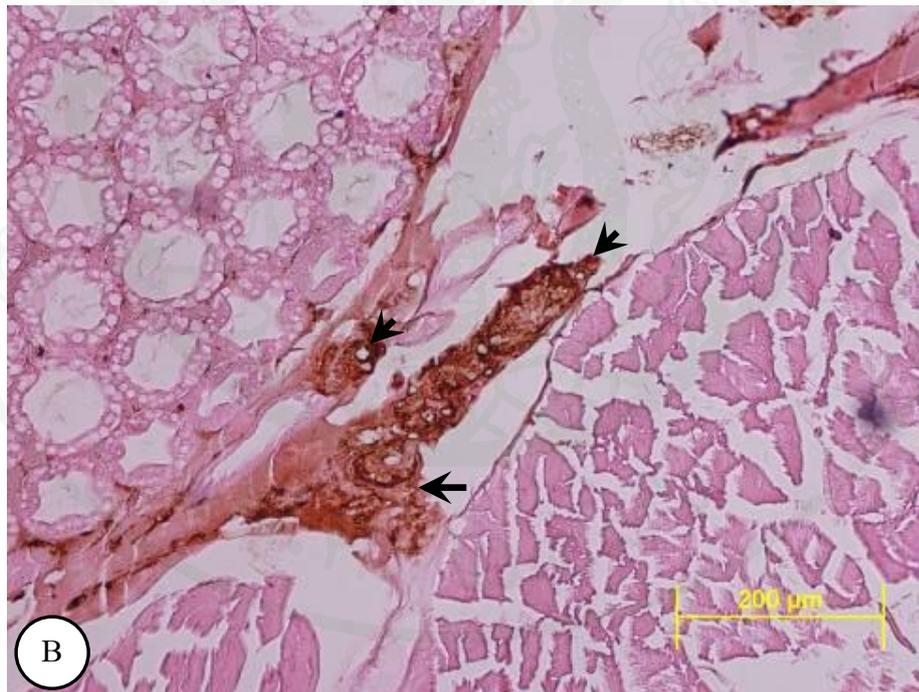
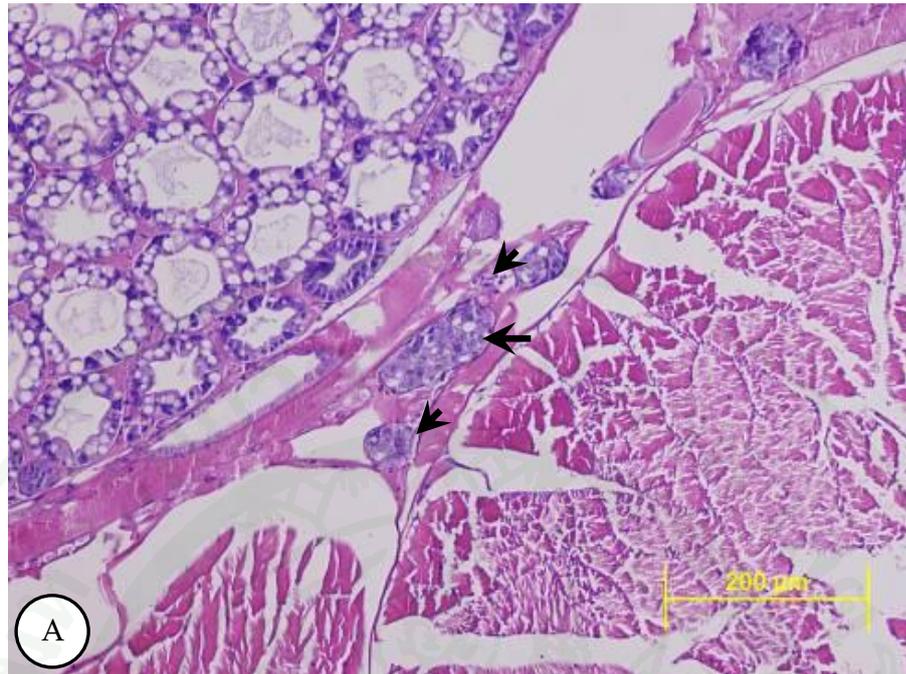
**ภาพที่ 28** การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (28A) พบเซลล์กล้ามเนื้อของกุ้งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (28B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200 μm)



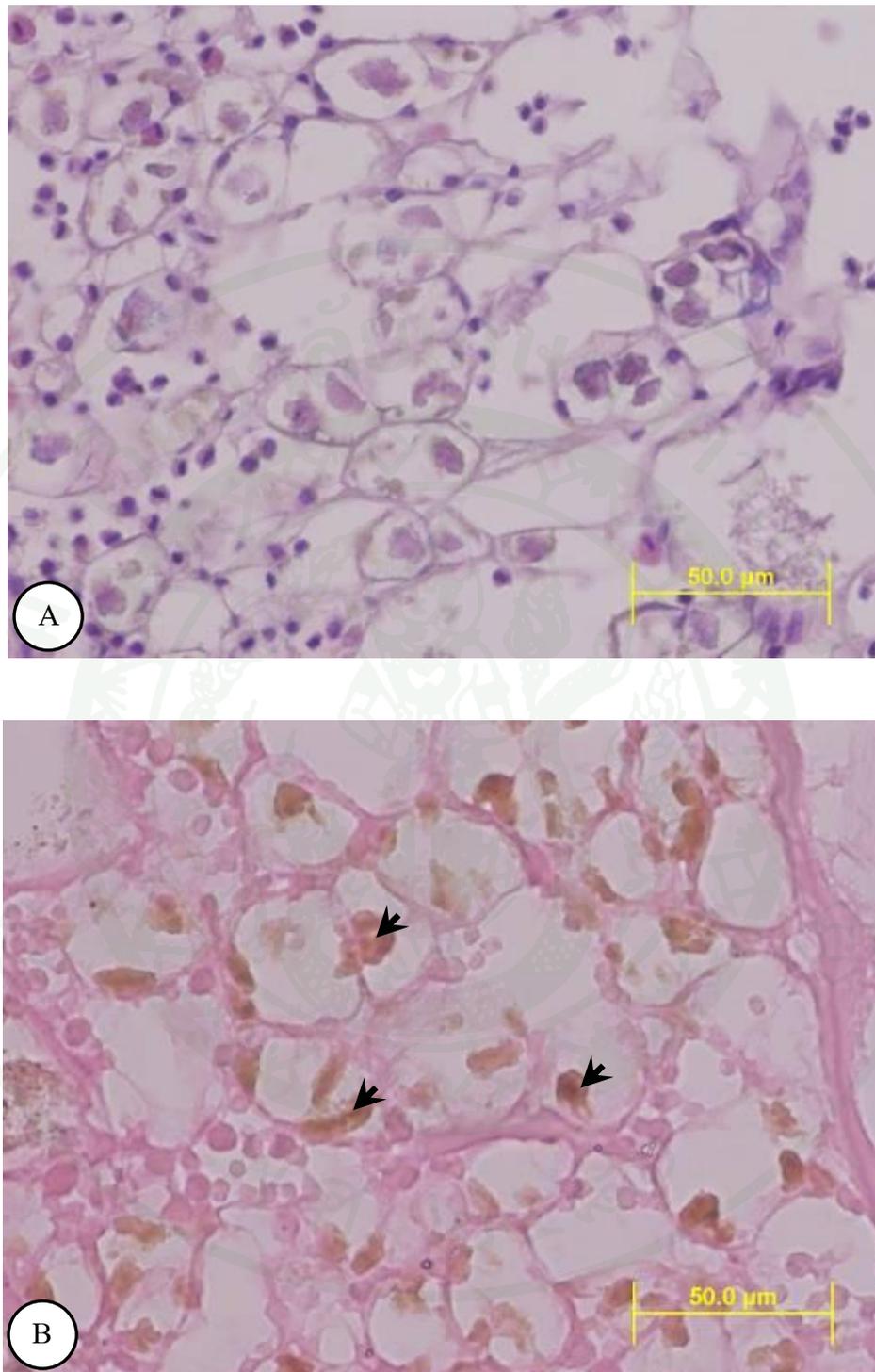
ภาพที่ 29 พยาธิสภาพกล้ามเนื้อหัวใจของกุ้งขาวที่ป่วยหลังจากได้รับเชื้อ YHV ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย น้ำความเค็มต่ำ พบ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) (H&E, bar = 50.0μm)



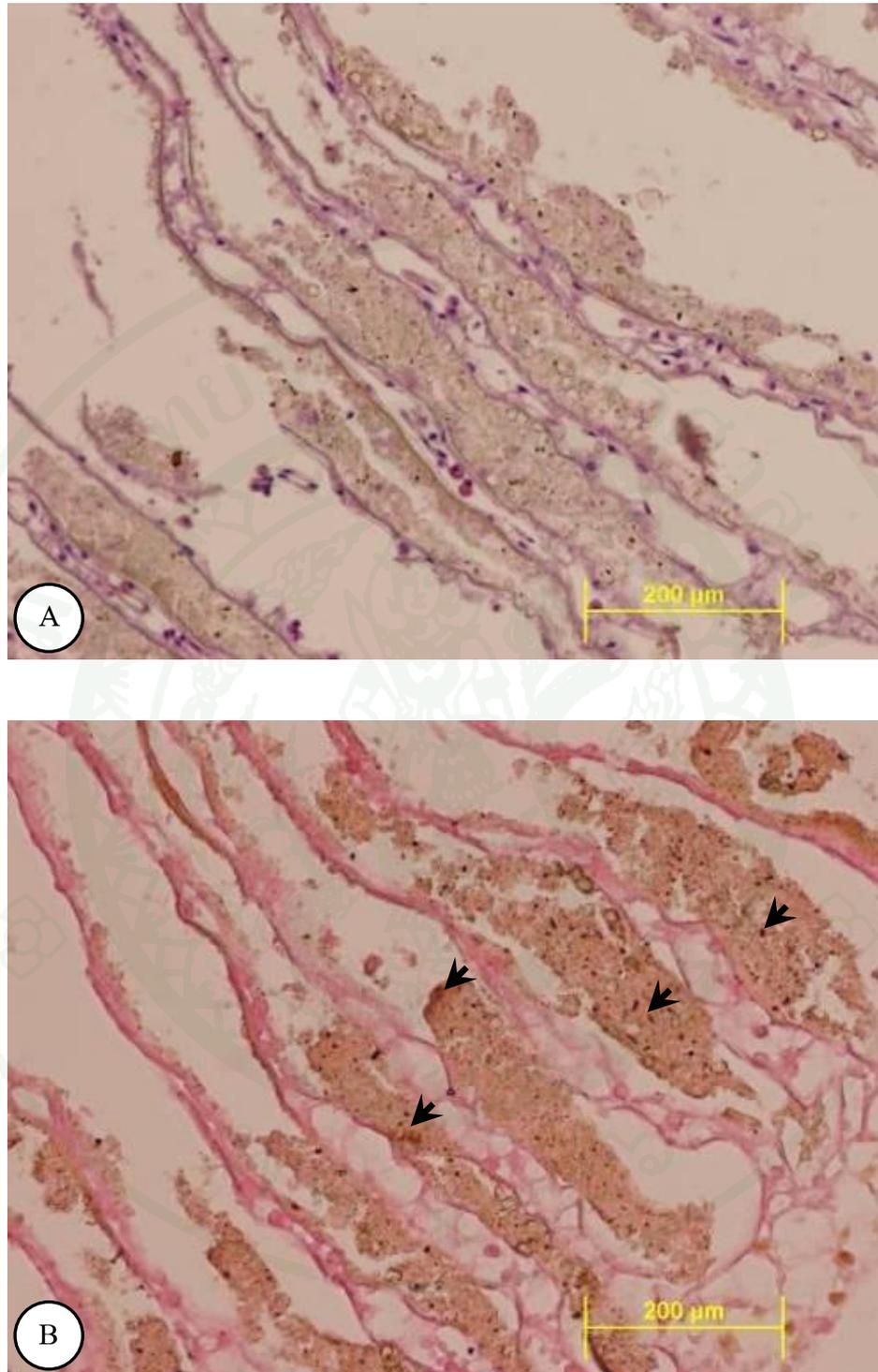
ภาพที่ 30 แสดงการตายของเซลล์เม็ดเลือดในบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจของกุ้งขาวที่ติดเชื้อมีลักษณะ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้) (H&E) (30A) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (30B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอล แอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 500µm)



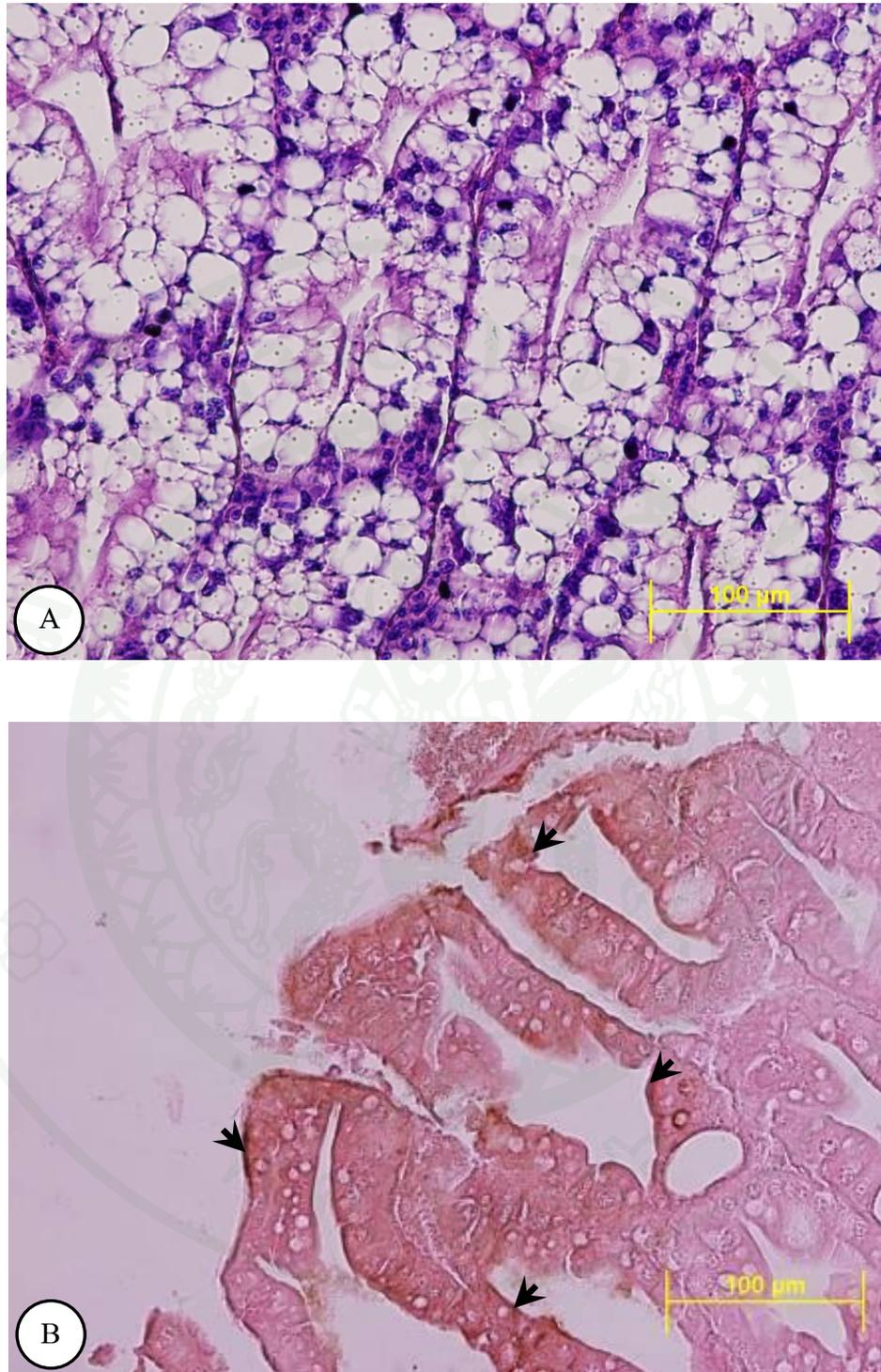
ภาพที่ 31 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (31A) พบการตายของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของกล้ามเนื้อที่ติดเชื้อ (ลูกศรชี้) เปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (31B) พบเซลล์ที่ติดเชื้อ YHV ติดสีน้ำตาลของ โมโนโคลนอล แอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200 $\mu$ m)



ภาพที่ 32 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (32A) บริเวณเหงือกของปูนาที่ติดเชื้อ ไม่พบความผิดปกติ แต่เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (32B) พบ การติดเชื้อ YHV ในบริเวณดังกล่าวโดยพบการติดสีน้ำตาลของโมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 50.0μm)



**ภาพที่ 33** การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (33A) บริเวณเนื้อของปมไม่พบความผิดปกติเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (33B) พบการติดเชื้อ YHV ในบริเวณดังกล่าวโดยพบกาตีสีน้ำตาลของโมโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV (ลูกศรชี้) (bar = 200μm)



ภาพที่ 34 แสดงเซลล์ตับและตับอ่อนของกิ้งก่ากรมที่ได้รับเชื้อ YHV ซึ่งไม่พบความผิดปกติ (H&E) (34A) แต่เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (34B) พบ การติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยพบการติดสีน้ำตาลของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่จำเพาะต่อ YHV ในเซลล์ดังกล่าว (ลูกศรชี้) (bar = 100μm)



ภาพที่ 35 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี histopathology (H&E) (35A) ไม่พบว่ามี การผิดปกติของเซลล์ บริเวณเหงือกของถุงฝอย แต่เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี immunohistochemistry (35B) พบการติดเชื้อ YHV โดยพบการติดสีน้ำตาล ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี Y19 ที่ จำเพาะต่อ YHV ในเซลล์ดังกล่าว(ลูกศรชี้)(bar = 100µm)

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

1. การศึกษาการเกิดโรคหัวเหลือง (Yellow-head Disease; YHD) และชนิดของพาหะในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมด้วยน้ำความเค็มต่ำ จำนวนทั้งสิ้น 29 ฟาร์มในจังหวัดราชบุรี พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในตัวอย่างที่รวบรวมจากฟาร์มที่ 8 ฟาร์มที่ 9 และฟาร์มที่ 24 โดยสัตว์ที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในฟาร์มดังกล่าวได้แก่ กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) และปูนา (*Somanniathelphusa germaini*)

2. การจำแนกชนิดของไวรัสหัวเหลืองในกุ้งขาวแวนนาไมโดยวิธีทางชีวโมเลกุล ผลจากการศึกษา พบว่าเชื้อไวรัสหัวเหลืองนี้เป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ YHV1-b ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์อื่น ๆ คือ มีโปรตีน gp-116 ที่ขาดหายไป

3. การศึกษาพาหะการเกิดโรคหัวเหลืองในห้องปฏิบัติการโดยการนำปูนา (*Somanniathelphusa germaini*), กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) และกุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) ที่ปลอดเชื้อไวรัสมาฉีด และแช่ด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่สกัดจากกุ้งขาวแวนนาไมจากนั้นสังเกตอัตราการตายและตรวจการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวพบว่าสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิด ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไม่พบการตายของพาหะทุกตัว ในระหว่างทำการศึกษา จึงสรุปได้ว่าสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิดที่ทำการศึกษานั้นทนทานต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลังจากได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลาถึง 28 วัน โดยกุ้งก้ามกรามและปูนาที่ได้รับเชื้อสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้หมดภายในเวลา 28 วัน ในขณะที่กุ้งฝอยทั้งหมดสามารถกำจัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ภายในเวลา 21 วัน และเมื่อนำปูนา กุ้งก้ามกรามและกุ้งฝอยที่ปลอดเชื้อไวรัสมาเลี้ยงนำขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้สัตว์พาหะกิน พบว่าสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิด ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไม่พบการตายของสัตว์ทดลองทุกตัวที่กินกุ้งขาวแวนนาไมที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

4. ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากพาหะสู่กุ้งขาวแวนนาไม โดยนำกลุ่มสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กุ้งก้ามกราม กุ้งฝอยและปูนาที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองหลังจากนั้นเลี้ยงไว้เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วันก่อนนำไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 8-10 กรัมที่ปลอดเชื้อ

เป็นเวลา 7 วันแล้วสังเกตอัตราการตาย จะเห็นได้ว่ากึ่งก้ามกราม กึ่งฝอย และปูนาสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ YHV-1b ไปยังกึ่งขาวแวนนาไม่ได้

เมื่อนำกลุ่มสัตว์พาหะทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กึ่งก้ามกราม กึ่งฝอย และปูนาที่ฉีดด้วยเชื้อไวรัสหัวเหลืองหลังจากนั้นเลี้ยงไว้เป็นเวลา 3, 7 และ 14 วันก่อนนำไปให้กึ่งขาวแวนนาไม่ขนาด 8-10 กรัมที่ปลอดเชื้อกินติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน พบว่ากึ่งก้ามกราม กึ่งฝอย และปูนาสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสหัวเหลืองสายพันธุ์ YHV-1b ไปยังกึ่งขาวแวนนาไม่ได้

5. การศึกษาความรุนแรงของการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกึ่งขาวแวนนาไม่จากการติดเชื้อไวรัสเข้าไปในกึ่งทดลองและการให้กึ่งปกติกินกึ่งที่ป่วย เป็นโรคหัวเหลือง แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีระดับความเค็มแตกต่างกัน พบว่ากึ่งที่ติดเชื้อไวรัส ในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 5 พีพีทีจะพบอัตราการตายสูงที่สุดและตายเร็วที่สุดในขณะที่กึ่งที่เลี้ยงในน้ำความเค็ม 30 พีพีที จะตายช้าที่สุด โดยสามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึงประมาณ 20 วัน ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อหัวเหลือง โดยการฉีดเชื้อ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับเชื้อหัวเหลืองโดยการกินกึ่งที่ติดเชื้อหัวเหลืองจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 40 วัน

#### ข้อเสนอแนะ

สำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงกึ่งในพื้นที่ที่พบการระบาดของโรคหัวเหลือง ควรมีระบบในการป้องกันสัตว์พาหะต่าง ๆ ไม่ให้เข้ามาในพื้นที่เลี้ยง เกษตรกรควรมีบ่อพักน้ำและพักน้ำไว้อย่างน้อยเป็นเวลา 28 วัน เพื่อให้สัตว์พาหะที่ติดเชื้อมีการกำจัดเชื้อภายในร่างกายออกจนหมดก่อน จึงค่อยเริ่มปล่อยกึ่งลงเลี้ยงในรอบต่อไป ในกรณีที่เกษตรกรต้องการปล่อยกึ่งลงเลี้ยงเร็วขึ้น ควรพิจารณาใช้สารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อไวรัสในน้ำและกำจัดสัตว์พาหะในบ่อเลี้ยงก่อนปล่อยลูกกึ่ง

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรณีการ สิริสิงห์. 2522. **เคมีของน้ำ น้ำโสโครกและการวิเคราะห์**. โรงพิมพ์บริษัทสารมวลชน จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ชลอ ลี้มสุวรรณ. 2543. **กุ้งไทย 2000 คู่ความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม**. โรงพิมพ์เจริญรัฐ การพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- ชลอ ลี้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย**. สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชเนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัทเมจิกพับบลิชซัน จำกัด, กรุงเทพฯ.
- นิคม ละอองศิริวงศ์. 2546. การวิเคราะห์น้ำ, น.63-148. ใน นิคม ละอองศิริวงศ์ และ ยงยุทธ ปริดาลัมพะบุตร, บรรณาธิการ. **วิธีวิเคราะห์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง (Method of Water Analysis for Coastal Aquaculture)**. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง.
- ประวิทย์ ไตวัฒน์ และ พิภพ ปราบณรงค์. 2539. การสะสมตัวและการเคลื่อนที่ของไอออนจากน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงกุ้งในน้ำดินตื้นที่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและทรัพยากรดินในอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา. **ว. สงขลานครินทร์**. 18(1): 113-127.
- ปิยนุช พรหมภร. 2550. **โรคสำคัญในการเลี้ยงกุ้งขาวแอฟฟิกันในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรเทพ ปลอดภัย. 2537. **การศึกษาช่วงระยะเวลาการมีชีวิตของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในน้ำทะเล และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- พุทธ ต่องแสงจินดา. 2544. การจัดการสารประกอบไนโตรเจนและออกซิเจนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด. กลุ่มวิจัยวิศวกรรมการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย กรมประมง, สงขลา
- มาลินี วิชชาวูช และ สมยศ สิทธิโชคพันธ์. 2548. การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบกรมประมง. ว. กรมประมง 58 (2): 170-171.
- ศิริเพ็ญ ตรีชัยชาพร. 2543. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- สิทธิ บุญรัตผลิน, สถาพร ดิเรกบุษราคัม, จิราพร เกสรจันทน์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์, ไชยยุทธ จันทนชุกกลิ่น และ กิจการ สุขมาตย์. 2535. **Baculovirus** สาเหตุของโรคกุ้งหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ, น. 200-205. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2535. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, บางเขน, กรุงเทพฯ.
- สุธี เกื้อเกตุ. 2543. การสะสมและการกระจายของไวออนจากน้ำทะเลในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำเขตน้ำจืด: กรณีศึกษาที่อำเภอบ้านสร้าง จังหวัดปราจีนบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมศักดิ์ ปณีตชัยยศ. 2554. ยุทธศาสตร์ตลาดกุ้งไทย 2554 สถานการณ์และยุทธศาสตร์ทางการตลาด. ว.งานวันกุ้งไทย. 21: 107-110.
- Albaladejo, J.D., L.M. Tapay, V.P. Migo, C.G. Alfafara, J.R. Somga, S.L. Mayo, R.C.Miranda, K. Natividad, F.O.Magbanua, T. Itami, M. Matsumura, Jr. E.C.B. Nadala and P.C. Loh. 1998. Screening for shrimp viruses in the Philippines, pp. 251-253 *In*. Flegel TW. ,eds. **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

Anantasomboon, G., R. Poonkhum, N. Sittidilokratna, T.W. Flegel and B. Withyachumnarnkul. 2008. Low viral loads and lymphoid organ spheroids are associated with yellow head virus (YHV) tolerance in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology** 32, 613–626.

Bell, T. A. And D. V. Lightner. 1998. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Boonyaratpalin, S., K. Supamattaya, J. Kasornchadra, S. Direkbusaracom, U. Ekpanithanpong and C. Chantanachookin. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathol.** 28: 10-109.

Boyd, C. E. 1982. **Water Quality in Management for Fish Pond Culture**. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Netherlands.

\_\_\_\_\_. 1989. **Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming Series 2**. Fisheries and Allied Aquaculture Department, Auburn University, Auburn, Alabama.

\_\_\_\_\_. 1990. **Water Quality in Ponds for Aquaculture of Fisheries**. Department of Fisheries and Allied Aquaculture Department, Auburn University, Auburn, Alabama.

\_\_\_\_\_, and A. W. Fast. 1992. Pond monitoring and management, pp. 497-513. In A. W. Fast and L. J. Lester, eds. **Marine Shrimp Culture Principles and Practices**. Elsevier Science, Amsterdam.

Brawn, T. E., A. W. Morley., N. T. Sanderson and R. D. Tait 1983. Report of a large fish kill resulting from natural acid water condition in Austrawa. **J. Fish. Biol.** 22(1): 43-47.

Brock, J. A. and K. Main. 1994. **A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei***. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii.

- Bray, W. A., A. L. Lawrence and J. R. Leung- Trujillo. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei* with observations on interactions of IHNV virus and salinity. **Aquaculture** 122: 133-146.
- Castille, J. R., L. Frank and A. L. Lawrence. 1981. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentration in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 68A: 75-80.
- Chantanachookin, C., S. Boonyaratpalin, J. Kasornchandra, S. Direkbusarakom, U. Aekpanithanpong, K. Supamattaya, S. Sriuraitana and T. W. Flegel. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow head disease. **Dis. Aquat. Org.** 17: 145-157.
- Chayaburakul, K., G. Nash, P. Pratanpipat, S. Sriurairata and B. Withyachumnarnkul. 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. **Dis. Aquat. Org.** 60: 89-96.
- Chuchird, N., N. Kensho , K. Takeru, F. Makoto , U. Shoji and Y. Takashi . 2002. A variable region on the chlorovirus CVK2 genome contains five copies of the gene for Vp260, a viral-surface glycoprotein. **Virology** 295(2):289-98.
- Cowley, J.A., C.M. Dimmock, C. Wongteerasypaya, V. Boonsaeng, S. Panyim and P.J. Walker. 1999. Yellow head virus from Thailand and gill associated-virus from Australia are closely related but distinct prawn viruses. **Dis. Aquat. Org.** 36: 153-157.
- \_\_\_\_\_, M.R. Hall, L.C. Cadogan, K.M. Spann and P.J. Walker. 2002. Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 50: 95-104.

- \_\_\_\_\_, L. C. Cadogan, K. A. Spann, N. Sittidilokratna and P. J. Walker. 2004. The gene encoding the nucleocapsid protein of gill-associated nidovirus of *Penaeus monodon* prawns is located upstream of the glycoprotein gene. **J. Virol** 78, 8935–8941.
- \_\_\_\_\_, K. V. Rajendran, R. J. McCulloch and P. J. Walker. 2004b. The detection of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) in Australian *Penaeus monodon* and its potential evolutionary origin. **Australasian Aquaculture 2004, Book of Abstracts**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, p. 107.
- Flegel, T.W. 1997. Special topic review: Major viral disease of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 433-442
- \_\_\_\_\_. and S. Sriurairatana. 1993. Black Tiger Prawn Disease in Thailand, pp. 1-21. In D. Akiyama, eds. **Technical Bulletin**. American Soybean Association, Singapore.
- \_\_\_\_\_, D.W. Fegan and S. Sriurairatana. 1995a. Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand, pp. 65-79. In Shariff, M., Arthur, J.R. and Subasinghe, R.P., eds. **Diseases in Asian Aquaculture II, Fish Health Section**, Asian Fish Soc, Manila.
- \_\_\_\_\_, S. Sriurairatana, C. Wongterasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim and B. Withyachumnarnkul. 1995b. Progress in characterization and control of yellow head virus of *Penaeus monodon*, pp 76-83. In C.L., Browdy and Hopkins, J.S., eds. *Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, LA.
- \_\_\_\_\_. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture** 258: 1-33.

Flegel, T.W. 2007a. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Dev. Comp. Immunol.** 31: 217-231.

Flint, S. J., L. W. Enquist, R. M. Krug, V. R. Racaniello and A. M. Skalka. 2004. **Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.** 3<sup>rd</sup> ed. ASM Press.

Holthuis, L. B. 1980. **FAO Species Catalog. Vol. 1-Shrimp and Prawns of the World.** FAO Fisheries Synopsis No. 125, FAO, Rome.

Kongpradit R., J. Kasornchandra and S. Boonyaratanapalin. 1995. Susceptibility of postlarval stages of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV), p. 6 *In* Anon., eds. **Book of abstracts**, second symposium on diseases in Asian Aquaculture. Asian Fisheries Society, Manila.

Lightner, D. V. 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp.** World Aquaculture Society, Baton Rouge, L. A.

\_\_\_\_\_, R. M. Redman, B. T. Poulos, L. M. Nunan, J. L. Mari and K. W. Hasson. 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.** 16: 146-160.

\_\_\_\_\_, K.W. Hasson, B.L. Whit and R.M. Redman. 1998. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. **J. Aqua. Animal Health.** 10: 271-281

Limsuwan, C. 1991. **Handbook for Cultivation of Black Tiger Prawn.** Tansetakit, Bangkok

- Lo, C.F., C.H. Ho, S.E. Peng, C.H. Chen, H.C. Hsu, Y.L. C.F. Chang, K.F. Liu, M.S. Su, C.H. Wang and G.H. Kou. 1996b. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Dis. Aquat. Org.** 27: 215-225.
- Loh, P. C., E. Cesar, B. Nadala Jr., L. M. Tapay and Y. Lu. 1998. Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens, pp. 255-259. *In* T. W. Flegel, eds. **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Longyant, S., P. Sithigorngul, P. Chaivisuthangkura, S. Rukpratanporn, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 2005. Differences in susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. **Dis. Aquat. Org.** 64(1): 5-12.
- \_\_\_\_\_, S. Sattaman, P. Chaivisuthangkura, S. Rukpratanporn, W. Sithigorngul and P. Sithigorngul. 2006. Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). **Aquaculture**. 257: 83-91.
- Lu, Y., L. M., Tapay, J. A. Brock and P. C. Loh. 1994. Infection of the yellow head baculovirus (YBV) in two species of penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). **J. Fish. Dis.** 17: 649-656.
- \_\_\_\_\_, S. Zhu, F.S. Guo and S.Y. Wu. 1997. Electron microscopic observation on a nonoccluded baculo-like virus in shrimps. **Arch. Virol.** 142: 2073-8
- Ma, H., M.O. Robin and A.J. Jean. 2009. Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) : A reservoir host for yellow-head virus (YHV). **J. Invt. Pathol.** 101: 112-118.
- Madenjian, C. P. 1990. Patterns of oxygen production and consumption in intensively managed marine shrimp ponds. **Aquat. and Fish Management** 21: 407-417.

- Mayo, M. A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Arch. Virol.** 147: 1655-1663.
- Mohan, C. V., K. M. Shandar, S. Kulkarni and P. M. Sudha. 1998. Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. **Dis. Aquat. Org.** 34: 9-12.
- Munro J. and L. Owens. 2007. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against gill-associated virus and the development of an ELISA. **Aquaculture** 262: 173-182
- Nadala, E.C.B.J., L.M. Tapay and P.C. Loh. 1997b. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** 31: 141-146.
- Nash, G., A. Arkarjamon and B. Withyachumnarnkul. 1993. **Histological and rapid haemocytic diagnosis of yellow-head disease in *Penaeus monodon***, p. 84. *In* second symposium on disease in Asian aquaculture. University Pertanian Malaysia, Selangor Darul Ehsan, Malaysia.
- OIE. 2009. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009**. World Organization for Animal Health. Paris.
- \_\_\_\_\_. 2010. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2010**. World Organization for Animal Health. Paris.
- Owens, L. 1997. Special topic review: The history of the emergence of viruses in Australian prawn aquaculture. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 427-431.
- Pantoja, C.R. and D.V. Lightner. 2003. Necrotizing hepatopancreatitis (NHP): a review of diagnostic methods and geographic distribution, p 550. *In* G. J. Parsons. eds. **Book of abstracts. World Aquaculture Society**, Salvadore, Brazil.

- Rosenberry, B. 1997. World Shrimp Farming 1997. *In Shrimp News International*, San Diago.
- Samocha, T. M., A. D. David, A. L. Lawrance, C. R. Collins and P. Van Wyk. 2001. Intensive and super-intensive production of the Pacific white *Litopenaeus vannamei* in greenhouse-enclosed raceway systems. **Book of Abstracts. Aquaculture 2001**, Lake Buena Vista.
- Sang-oum, W., B. Withyachumnarnkul, T.W. Flegel and D.V. Lightner. 2003. **A new type of yellowhead virus (YHV) detected in growth-retarded shrimp from Thailand.** Aquaculture Asia 2003. World Aquaculture Society, Bangkok.
- Senapin, S., Y. Thaowbul, W. Gangnonngiw, N. Chuchird, S. Sriurairatana and T.W. Flegel. 2010. Impact of Yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone) in Thailand. **Fish Dis.** 33: 421-430.
- Sithigorngul, P., P. Chauyuchuwong, W. Sithigorngul, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and P. Menasveta. 2000. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 42: 27-34.
- \_\_\_\_\_, S. Rukpratanporn, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 2002. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 49: 71-76.
- Sittidilokratna, N., R.A.J. Hodgson, J.A. Cowley, S. Jitrapakdee, V. Boonsaeng, S. Panyim and P.J. Walker. 2002. The complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus. **Dis. Aquat. Org.** 50: 87-93
- \_\_\_\_\_, C. Chotwiwatthanakun, P. K. Wijegoonawardane, S. Unajak, A. Boonnad, W. Wangnai, S. Jitrapakdee, J. A. Cowley and P. J. Walker. 2009. A virulent isolate of yellow head nidovirus contains a deformed envelope glycoprotein gp116. **Virology.** 384: 192-200.

- Smith, L. L. and A. L. Lawrence. 1990. Feasibility of penaeid shrimp culture in inland saline ground water-fed pond. **Tex. J. Sci.** 42(1): 3-12.
- Spann K.M., J.E. Vickers and R.J.G. Lester. 1995. Lymphoid organ virus of *Penaeus monodon* from Australia. **Dis. Aquat. Org.** 23: 127-134.
- \_\_\_\_\_, J.A. Cowley, P.J. Walker and R.J.G. Lester. 1998. A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. **Dis. Aquat. Org.** 31: 169-179.
- \_\_\_\_\_, R.A. Donaldson, J.A. Cowley and P.J. Walker. 2000. Differences in the susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. **Dis. Aquat. Org.** 42: 221-5.
- Tang, K.F.J. and D.V. Lightner. 1999. A Yellow Head Virus Gene Probe: Nucleotide sequence and application for *in situ* hybridisation. **Dis. Aquat. Org.** 35: 165-173.
- \_\_\_\_\_, K.M. Spann, L. Owens and D.V. Lightner. 2002. In situ detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. **Aquaculture** 205: 1-5.
- Walker, P. J. and J.A. Cowley. 2000. Viral genetic variation: Implications for disease diagnosis and detection of shrimp pathogens, pp. 54-59 *In* P.J., Walker and R. Subasinghe.,eds. **FAO Fisheries Technical Paper No. 395**. FAO, Rome, Bangkok, Thailand.
- \_\_\_\_\_, J. A. Cowley, K. M. Spann, R. A. J. Hodgson R. A. J., M. R. Hall and B. Withyachumnarnkul. 2001. Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region, pp. 292-302. *In* C. L. Browdy and D. E. Jory, eds. **The New Wave, Proceeding of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001 and The World Aquaculture Society**. Baton Rouge, LA.

- Wang, R.F., W.W. Cao and C.E. Cerniglia. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 62, no. 4, p. 1242-1247.
- Wedemeyer, G. A., F. P. Meyer and L. Smith. 1976. **Book 5; Environmental Stress and Fish Diseases**. TFH Publications Inc., Neptune City NJ.
- Wickins, J. F. and D. O'C. Lee. 2002. **Crustacean Farming Ranching and Culture**. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Wijegoonawardane, P.K.M., J.A. Cowley, T. Phan, R.A.J. Hodson, L. Nielson, W. Kiatpathomchai and P.J. Walker. 2008. Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. **Virology**. 380, 213-225.
- Wongteerasupaya, C., J. E. Vickers, S. Sriurairatana, G. Nash, A. Akarajamorn, V. Boosaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T. W. Flegel. 1995. A non-occlude, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal rigin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.** 21: 69-77.
- \_\_\_\_\_, W. Thongchuea, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul, and T.W. Flegel. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) for *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. **Dis. Aquat. Org.** 31 : 181-186.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

## การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

### 1. วิธีการ fixed ตัวอย่าง

1.1 กิ่งที่มีขนาด 10 กรัมขึ้นไป จะฉีดน้ำยา Davidson's fixative เข้าไปในช่องปาก ส่วนหัว ด้านหลังใต้เปลือก ตับและตับอ่อน ส่วนท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้ายและลำตัวทั้งด้านท้องและด้านหลังให้ทั่ว ตัดเปลือกกิ่งตามแนวยาวตั้งแต่เปลือกช่วงท้องปล้องที่ 6 จนถึงส่วนหัว หลังจากแช่ตัวอย่างในน้ำยา Davidson's fixative ปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว เมื่อครบกำหนดย้ายกิ่งตัวอย่างไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ (เอทานอล) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดชิ้นเนื้อกิ่งบริเวณที่ต้องการศึกษา

1.2 กิ่งที่มีขนาดเล็ก เช่น ลูกกิ่งหรือกิ่งฝอย จะเก็บรักษาสภาพทั้งตัวได้ในน้ำยา Davidson's fixative

1.3 ปู หากมีขนาดใหญ่ จะเปิดกระดองและตัดเหงือกออก แล้วนำตัวอย่างเหงือกไปแช่ในน้ำยา Davidson's fixative ปริมาตร 10-20 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว เมื่อครบกำหนดย้ายตัวอย่างไปแช่ในเอธิลแอลกอฮอล์ (เอทานอล) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดตัวอย่างเหงือกให้ได้ตามขนาดที่ต้องการ

### 2. การเตรียมสารเคมีเพื่อการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

#### 2.1 น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

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

## 2.2 Hematoxylin และ Eosin (H&E)

### 2.2.1 เมเยอร์ฮีมาท็อกซิลิน (Mayer's hematoxylin)

ฮีมาท็อกซิลิน (hematoxylin crystal)	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
โซเดียมไอโอเดต (sodium iodate)	0.2	กรัม
แอมโมเนียมอาลัม หรือ โปแตสเซียมอาลัม	50	มิลลิลิตร
กรดซิตริก (citric acid)	1	กรัม
คลอโรลไฮเดรต (chloral hydrate)	50	กรัม

วิธีเตรียม ละลายอาลัม (alum) ในน้ำกลั่น โดยไม่ต้องใช้ความร้อน แล้วเติมฮีมาท็อกซิลิน คนให้ละลายในสารละลายนี้ จากนั้นเติมโซเดียมไอโอเดต กรดซิตริก และคลอโรลไฮเดรต ใช้แท่งแก้วคนจนส่วนประกอบเหล่านี้ละลายเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ สีในขั้นสุดท้ายจะเป็นสีม่วงแดง (reddish violet) สีนี้ต้องบ่มให้สุกใช้เวลาประมาณ 6-8 สัปดาห์ ถึงแม้ว่าพอจะนำมาใช้ได้ภายใน 1-2 สัปดาห์ก็ตาม

### 2.2.2 อีโอซิน (eosin) ซึ่งใช้เป็นสีย้อมซ้ำ (counterstain) ของฮีมาท็อกซิลิน มีสูตรดังนี้

#### 1% สตีอก แอลกอฮอล์อีโอซิน

Eosin Y, water soluble	1	กรัม
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากันแล้วจึงเติม		
แอลกอฮอล์ 95%	80	มิลลิลิตร

#### สารละลาย เวคกิงอีโอซิน (working solution)

สารละลายอีโอซินสตีอก	1	ส่วน
----------------------	---	------

แอลกอฮอล์ 80% 3 ส่วน  
ก่อนใช้ให้เติม 0.5 มิลลิลิตรของกรดแอซิดิกเข้มข้นต่อ 100 มิลลิลิตรของสีแล้วคนให้เข้ากัน

### 3. วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา

3.1 หากเป็นก้อนขนาดเล็ก จะใช้กึ่งทั้งตัว ห่อด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ส่วนในก้อนขนาดใหญ่ จะตัดเฉพาะส่วนที่ต้องศึกษา ได้แก่ อวัยวะในระบบท่อหุ้มร่างกาย ระบบกล้ามเนื้อ ระบบหมุนเวียนเลือด ระบบหายใจ ระบบย่อยอาหาร โดยตัดห้มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

3.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) สารเคมีที่ใช้ขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ เรียกว่า สารที่ใช้ขจัดน้ำ (dehydrant) เช่น เอทิลแอลกอฮอล์ อะซิโตน เป็นต้น โดยเนื้อเยื่อจะต้องผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปสูง เริ่มจาก 70% 80% 95% จนถึง 100% แอลกอฮอล์ และแต่ละขั้นควรเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง โดยทั่วไปจะนิยมใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่า เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งจะมีขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1988) ดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	50% propanol	30-60
2	70% propanol	30-60
3	95% propanol I	30-60
4	95% propanol II	30-60
5	95% propanol III	30-60
6	100% propanol I	30-60
7	100% propanol II	30-60
8	100% propanol III	30-60
9	Histosolve I	60
ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thermo Shandon		
10	Histosolve II	90
11	Paraplast I	90
12	Paraplast II	120

3.3 การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing or dealcoholization) เป็นการนำสารเคมีตัวใหม่เข้ามาแทนที่สารที่ใสขจัดน้ำ และสารเคมีตัวนี้จะเป็นตัวกลางนำสารที่ใสฝังเนื้อเยื่อเข้าสู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ มีอยู่หลายชนิด เช่น ไซลีน โทลูอิน เบนซีน คลอโรฟอร์ม และ ซีคาร์บูไดออกไซด์ เป็นต้น

3.4 ขั้นตอน infiltration เป็นการทำให้สารที่ใสฝังเนื้อเยื่อที่หลอมเหลวแทรกซึมเข้าไปในเซลล์และเนื้อเยื่อ สารที่นิยมใช้คือ พาราฟิน หรือ จีผึ้ง (wax) เมื่อเนื้อเยื่อผ่านการแทรกซึมของพาราฟินเรียบร้อยแล้ว จะมีพาราฟินแทรกอยู่ทั่วไปในเซลล์และเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟินที่หลอมเหลว แล้วทำให้พาราฟินรอบ ๆ เนื้อเยื่อมีอุณหภูมิลดลงจนแข็งตัว โดยมีเนื้อเยื่ออยู่ตรงกลาง วิธีการนี้เรียกว่า การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)

3.5 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้มาตัดแต่งหน้าบดให้เรียบ(trimming)

3.6 การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (sectioning) นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome รุ่น LeicaRM-2145) ให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร ใช้ปากคีบปลายแบนคีบเนื้อเยื่อที่ตัดไว้วางลงบนแผ่นสไลด์ ใช้หลอดหยดเอทานอล 50% ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำไปลอยบนน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 43-45 องศาเซลเซียส เลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วซ้อนด้วยแผ่นสไลด์ที่สะอาด ใช้ทิชชูชุบน้ำให้แห้ง แล้วนำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส และปล่อยสไลด์ให้แห้งข้ามคืน (over night)

3.7 นำเนื้อเยื่อมาย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธี Bell and Lightner (1998) ตามขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	xylene	5
2	xylene	4
3	100% alcohol	1
4	100% alcohol	1
5	95% alcohol	1
6	95% alcohol	1
7	ล้างน้ำ	2
8	hematoxylin	2
9	ล้างน้ำ	2
10	Blueing Solution (dilute)	จุ่ม 10-20 ครั้ง
11	ล้างน้ำ	1
12	95% alcohol	จุ่ม 10-20 ครั้ง
13	Eosin	1
14	95% alcohol	0.15
15	95% alcohol	0.15
16	100% alcohol	1
17	100% alcohol	1
18	xylene	1
19	xylene	2
20	xylene	2

3.8 ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) โดยใช้ น้ำยา permount

3.9 นำสไลด์ถาวรที่ได้มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง (Light microscope) พร้อมถ่ายภาพบันทึกไว้

หมายเหตุ: นิวเคลียส-ติดสีน้ำเงิน

ไซโทพลาสซึม-ติดสีชมพูถึงแดง

## การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษา immunohistochemistry (IHC)

### 1. วิธีการ fixed ตัวอย่าง

วิธีเดียวกันกับการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

### 2. การเตรียมสารเคมีเพื่อการศึกษา immunohistochemistry

#### 2.1 น้ำยาคงสภาพ (Davidson's fixative)

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

#### 2.2 สารละลายเคลือบสไลด์ (coated slide solution)

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

#### 2.3 Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.00	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.20	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.20	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2.4 สารละลาย calf serum 10% (P1<sup>+</sup>)

Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร

## 2.5 สี eosin Y 0.2% ในเอทานอล 95%

สี eosin Y	0.2	กรัม
เอทานอล 95%	100.0	มิลลิลิตร

3. การตรวจการติดเชื้อ YHV ด้วยวิธี immunohistochemistry (Sithigorngul *et al.*, 2002)

3.1 หากเป็นกึ่งขนาดเล็ก จะใช้กึ่งทั้งตัว ห่อด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ส่วนในกึ่งขนาดใหญ่จะตัดเฉพาะส่วนที่ต้องศึกษา ได้แก่ อวัยวะในระบบท่อหุ้มร่างกาย ระบบกล้ามเนื้อ ระบบหมุนเวียนเลือด ระบบหายใจ ระบบย่อยอาหาร โดยตัดที่มีความหนาของชิ้นเนื้อไม่เกิน 4 มิลลิเมตร

3.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาบรรจุใน embedding cassette แล้วผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) สารเคมีที่ใช้ขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ เรียกว่า สารที่ใช้ขจัดน้ำ (dehydrant) เช่น เอทิลแอลกอฮอล์ อะซีโตน เป็นต้น โดยเนื้อเยื่อจะต้องผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปสูง เริ่มจาก 70% 80% 95% จนถึง 100% แอลกอฮอล์ และแต่ละขั้นควรเปลี่ยนน้ำยา 2 ครั้ง โดยทั่วไปจะนิยมใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่า เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ) ซึ่งจะมีขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของ Bell and Lightner (1998) ดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	50% propanol	30-60
2	70% propanol	30-60
3	95% propanol I	30-60
4	95% propanol II	30-60
5	95% propanol III	30-60
6	100% propanol I	30-60

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
7	100% propanol II	30-60
8	100% propanol III	30-60
9	Histosolve I	60
ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thermo Shandon		
10	Histosolve II	90
11	Paraplast I	90
12	Paraplast II	120

3.3 จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างวางในแม่พิมพ์ (mold) เพื่อให้เป็นแท่งด้วย พาราฟิน โดยเครื่อง paraffin embedding (Shandon Histocentre 2)

3.4 นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้มาตัดแต่งหน้าให้เรียบ (trimming)

3.5 การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (sectioning) นำแท่งชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่อง ตัดชิ้นเนื้อ (microtome รุ่น LeicaRM-2145) ให้มีความหนาประมาณ 7-8 ไมโครเมตร ใช้ปากคีบ ปลายแบนคีบเนื้อเยื่อที่ตัดไว้วางลงบนแผ่นสไลด์ ใช้หลอดหยดเอทานอล 50% ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำไปลอยบนน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 43-45 องศาเซลเซียส เลือก ตัวอย่างที่สมบูรณ์แล้วซ้อนด้วยแผ่นสไลด์ที่ coated ด้วยสารละลายเคลือบสไลด์ ใช้ทิชชูซับให้แห้ง แล้วนำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส และ ปลอ่ยสไลด์ให้แห้งข้ามคืน (over night)

3.6 นำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อมาละลายเอาพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffization) โดยวาง สไลด์ลงบนตะกร้า (slide basket) แล้วนำไปจุ่มใน โดแก้วที่บรรจุโซลิน และดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	xylene	5-10
2	xylene	5
3	xylene	5
4	xylene:butanol (1:1)	5
5	butanol	5
6	95% alcohol	5
7	90% alcohol	5
8	80% alcohol	5
9	70% alcohol	5
10	ล้างน้ำกลั่น	5
11	10% formalin	10
12	น้ำกลั่น	5
13	น้ำกลั่น	5
14	น้ำกลั่น	5
15	PBS	5
16	PBS	5
17	PBS	5

3.7 การป้องกันการจับแบบไม่จำเพาะ (blocking) โดยหยดสารละลาย P1<sup>+</sup> ให้คลุมแต่ละเนื้อเยื่อด้วยไมโครปิเปต บ่มในที่ชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3.8 ดูดสารละลาย P1<sup>+</sup> ในแต่ละเนื้อเยื่อออก หลังจากนั้นใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Y19 (Sithigorngul et al., 2002) ของ YHV ให้คลุมแต่ละเนื้อเยื่อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.9 ล้างแอนติบอดีตัวแรกออกจากเนื้อเยื่อ โดยการจุ่มขึ้นลงในน้ำกลั่น 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.10 บ่มด้วย goat anti-mouse-HRP antibody ในอัตราส่วน 1: 1000 เป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.11 ล้างแอนติบอดีตัวที่สองออกจากเนื้อเยื่อโดยการจุ่มลงในน้ำกลั่น 3 ครั้ง หลังจากนั้นแช่ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3.12 นำเนื้อเยื่อมาแช่ในสารละลายสับสเตรท (0.03% DAB (1หลอด), 0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10ไมโครลิตร) ใน PBS 50 มิลลิตร) เป็นเวลา 5 นาที บริเวณที่แอนติบอดีจับอยู่จะเกิดสีน้ำตาล

### 3.2 การย้อมเนื้อเยื่อทับด้วยสีอีโอซิน

#### 3.2.1 ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อและย้อม eosin

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	70% alcohol	10
2	80% alcohol	10
3	90% alcohol	10
4	95% alcohol	10
5	Eosin	2
6	95% alcohol	0.5-1
7	butanol	10
8	butanol:xylene (1:1)	10
9	xylene	10
10	xylene	10
11	xylene	10

#### 3.2.2 ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) โดยใช้ น้ำยา permount

3.2.3 นำสไลด์ถาวรที่ได้มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง ซึ่งเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดีจะเห็นเป็นสีน้ำตาล พร้อมถ่ายภาพบันทึกไว้



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 -ve +ve



ตารางผนวกที่ ข1 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 1 และ 2

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 1/1 กุ้งฝอย	-
2	F 1/2 กุ้งฝอย	-
3	F 1/3 กุ้งฝอย	-
4	F 1/4 กุ้งฝอย	-
5	F 2/1 กุ้งฝอย	-
6	F 2/2 กุ้งฝอย	-
7	F 2/3 กุ้งฝอย	-
8	F 2/4 กุ้งฝอย	-
9	F 2/5 กุ้งฝอย	-
10	F 2/6 กุ้งฝอย	-
11	F 2/7 กุ้งฝอย	-
12	F 2/8 กุ้งฝอย	-
13	F 2/19 กุ้งฝอย	-
14	F 2/20 กุ้งฝอย	-
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 -ve +ve



ตารางผนวกที่ ข2 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 3 และ 4

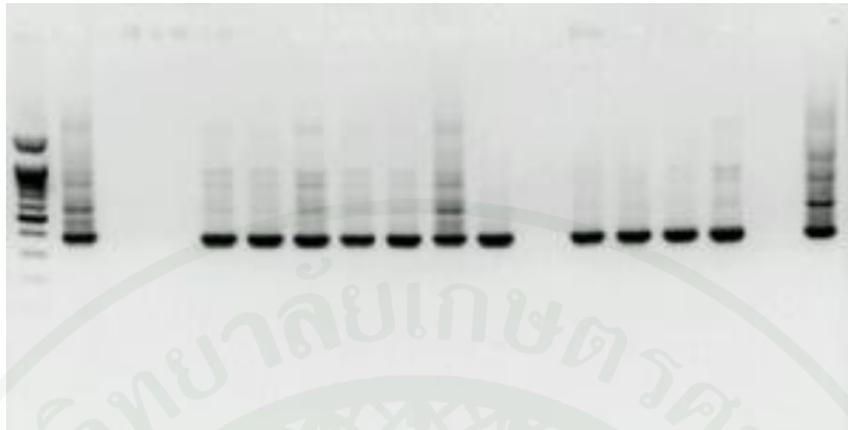
Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 3/1 กุ้งฝอย	-
2	F 3/2 กุ้งฝอย	-
3	F 3/3 กุ้งฝอย	-
4	F 3/4 กุ้งฝอย	-
5	F 3/5 กุ้งฝอย	-
6	F 4/1 กุ้งฝอย	-
7	F 4/2 กุ้งฝอย	-
8	F 4/3 กุ้งฝอย	-
9	F 4/4 กุ้งฝอย	-
10	F 4/5 กุ้งฝอย	-
11	F 4/6 กุ้งฝอย	-
12	F 4/7 กุ้งฝอย	-
13	F 4/8 กุ้งฝอย	-
14	F 4/9 ปูนา	-
15	F 4/17 ปูนา	-
-ve	DEPC (Negative control)	-
+ve	(Positive control)	-



ตารางผนวกที่ ข3 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 5,6 และ 7

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 5/2 กุ้งฝอย	-
2	F 5/5 กุ้งฝอย	-
3	F 6/1 กุ้งฝอย	-
4	F 6/2 กุ้งฝอย	-
5	F 6/3 กุ้งฝอย	-
6	F 7/1 กุ้งฝอย	-
7	F 7/2 กุ้งฝอย	-
8	F 7/3 กุ้งฝอย	-
9	F 7/4 กุ้งฝอย	-
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

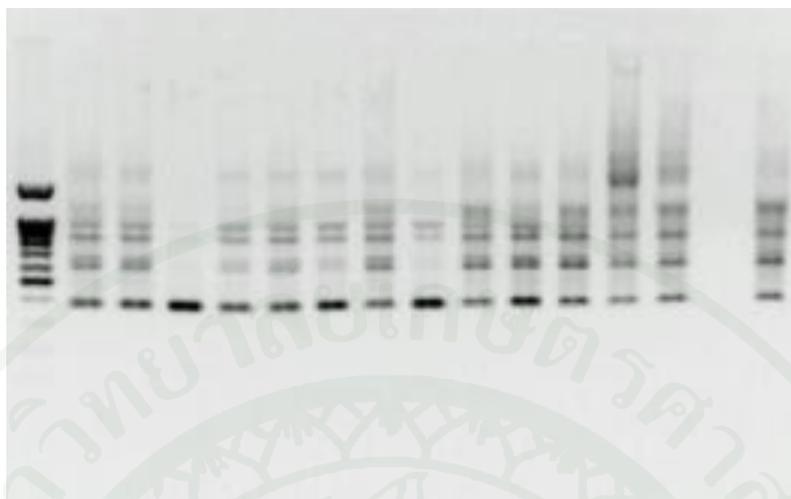
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 -ve +ve



ตารางผนวกที่ ข4 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 8

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F8/1 กุ้งก้ามกราม	+
2	F8/2 กุ้งก้ามกราม	-
3	F8/3 กุ้งก้ามกราม	-
4	F8/4 กุ้งก้ามกราม	+
5	F8/5 กุ้งก้ามกราม	+
6	F8/6 กุ้งก้ามกราม	+
7	F8/7 กุ้งก้ามกราม	+
8	F8/8 กุ้งก้ามกราม	+
9	F8/9 กุ้งก้ามกราม	+
10	F8/10 กุ้งก้ามกราม	+
11	F8/11 กุ้งก้ามกราม	-
12	F8/12 กุ้งก้ามกราม	+
13	F8/13 กุ้งก้ามกราม	+
14	F8/14 กุ้งก้ามกราม	+
15	F8/15 กุ้งฝอย	+
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 -ve +ve



ตารางผนวกที่ ๕ ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 9

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F9/1 กุ้งก้ามกราม	+
2	F9/2 กุ้งก้ามกราม	+
3	F9/3 กุ้งก้ามกราม	+
4	F9/4 กุ้งก้ามกราม	+
5	F9/5 กุ้งก้ามกราม	+
6	F9/7 กุ้งก้ามกราม	+
7	F9/8 กุ้งก้ามกราม	+
8	F9/9 กุ้งก้ามกราม	+
9	F9/10 กุ้งก้ามกราม	+
10	F9/11 กุ้งก้ามกราม	+
11	F9/12 กุ้งก้ามกราม	+
12	F9/13 กุ้งก้ามกราม	+
13	F9/6 กุ้งขาว	+
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

M 1 2 3 4 5 6 7 -ve +ve



ตารางผนวกที่ ข6 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 8 และ 9

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 8/16 จิงโจ้น้ำ	-
2	F 8/17 ปูนา	+
3	F 8/18 ปูนา	+
4	F 8/19 จิงโจ้น้ำ	-
5	F 9/14 กุ้งฝอย	+
6	F 9/15 ปลากระดี่	-
7	F 9/16 ปลากระดี่	-
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 -ve +ve



ตารางผนวกที่ ข7 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 10,11, 12 และ 13

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 10/1 กุ้งก้ามกราม	-
2	F 10/2 กุ้งขาว	-
3	F 10/3 กุ้งขาว	-
4	F 11/1 กุ้งก้ามกราม	-
5	F 11/2 กุ้งก้ามกราม	-
6	F 11/3 กุ้งก้ามกราม	-
7	F 12/1 กุ้งก้ามกราม	-
8	F 12/2 กุ้งก้ามกราม	-
9	F 13/1 กุ้งก้ามกราม	-
10	F 13/2 กุ้งขาว	-
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 -ve +ve 16 17



ตารางผนวกที่ ข8 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 14-19

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 14/1 กุ้งก้ามกราม	-
2	F 14/2 กุ้งก้ามกราม	-
3	F 15/1 กุ้งก้ามกราม	-
4	F 16/1 กุ้งก้ามกราม	-
5	F 16/2 กุ้งขาว	-
6	F 17/1 กุ้งขาว	-
7	F 17/2 กุ้งขาว	-
8	F 17/3 กุ้งก้ามกราม	-
9	F 18/1 กุ้งก้ามกราม	-
10	F 18/2 กุ้งก้ามกราม	-
11	F 19/1 กุ้งก้ามกราม	-
12	F 19/2 กุ้งก้ามกราม	-
13	F 19/3 กุ้งฝอย	-
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 -ve +ve



ตารางผนวกที่ ข9 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 20-24

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 20/1 กุ้งก้ามกราม	-
2	F 20/2 กุ้งก้ามกราม	-
3	F 20/3 กุ้งก้ามกราม	-
4	F 21/1 กุ้งก้ามกราม	-
5	F 21/2 กุ้งก้ามกราม	-
6	F 21/3 กุ้งขาว	-
7	F 22/1 กุ้งก้ามกราม	-
8	F 22/2 กุ้งก้ามกราม	-
9	F 22/3 กุ้งก้ามกราม	-
10	F 23/1 กุ้งก้ามกราม	-
11	F 23/2 กุ้งก้ามกราม	-
12	F 24/1 กุ้งก้ามกราม	-
13	F 24/2 กุ้งก้ามกราม	+
14	F 24/3 กุ้งก้ามกราม	-
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 -ve +ve



ตารางผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 24

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 24/4 กิ่งฝอย	-
2	F 24/5 กิ่งฝอย	-
3	F 24/6 กิ่งฝอย	-
4	F 24/7 กิ่งฝอย	-
5	F 24/8 หอยขม	-
6	F 24/9 หอยขม	-
7	F 24/10 แมลงปอ	-
8	F 24/11 แมลงคานา	-
9	F 24/12 ปลากะตัก	-
10	F 24/13 ปูนา	-
11	F 24/14 ปลากินยุง	-
12	F 24/15 ปลากินยุง	-
13	F 24/16 ปลากะตัก	-
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 -ve +ve



ตารางผนวกที่ ข11 ผลการวิเคราะห์ฟาร์มที่ 25-29

Lane	Case	Result
M	Molecular marker	
1	F 25/1 กุ้งก้ามกราม	-
2	F 25/2 กุ้งขาว	-
3	F 25/3 กุ้งฝอย	-
4	F 26/1 กุ้งก้ามกราม	-
5	F 26/2 กุ้งก้ามกราม	-
6	F 26/3 กุ้งก้ามกราม	-
7	F 27/1 กุ้งก้ามกราม	-
8	F 27/2 กุ้งก้ามกราม	-
9	F 27/3 กุ้งฝอย	-
10	F 28/1 กุ้งก้ามกราม	-
11	F 28/2 กุ้งก้ามกราม	-
12	F 28/3 กุ้งก้ามกราม	-
13	F 29/1 กุ้งก้ามกราม	-
14	F 29/2 กุ้งก้ามกราม	-
15	F 29/3 กุ้งก้ามกราม	-
-ve	DEPC (Negative control)	
+ve	(Positive control)	

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวภิญญา สงสุข
เกิดวันที่	26 ธันวาคม 2525
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	กศ.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา วท.ม. (สัตววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-