

การตรวจวินิจฉัยโรค Taura syndrome และ White spot syndrome โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา
ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม



นางสาว สุภัทัญญา ผลิตกุล

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974 - 17 - 6164 - 3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR DIAGNOSIS OF TAURA SYNDROME AND WHITE SPOT SYNDROME
IN CULTURED SHRIMPS: *Litopenaeus vannamei* AND *Penaeus monodon*



Miss Sukanya Phalitikul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Master of Science in Aquatic Animal Diseases

Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn university

Academic year 2004

ISBN 974 - 17 - 6164 - 3

นางสาว สุกัญญา ผลิตกุล : การตรวจวินิจฉัยโรค Taura syndrome และ White spot syndrome โดยเทคนิคทางอณูชีววิทยาในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม. (MOLECULAR DIAGNOSIS OF TAURA SYNDROME AND WHITE SPOT SYNDROME IN CULTURED SHRIMPS: *Litopenaeus vannamei* AND *Penaeus monodon*) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : สัตวแพทย์หญิง ดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.มีนา สาริระภุติ. จำนวนหน้า 101 หน้า. ISBN 974 - 17 - 6164 - 3

โรค Taura syndrome ในกุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*) และ White spot syndrome ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ก่อให้เกิดความสูญเสียในอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย งานวิจัยนี้พัฒนาการตรวจโรคทั้งสองด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ในกุ้งขาว และกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มจำนวน 39 ตัวอย่าง (n = 640 ตัว) จากทั้งหมด 4 จังหวัด ตั้งแต่เดือนกันยายน 2546 ถึงกรกฎาคม 2547 ตรวจวินิจฉัยโรค Taura syndrome ด้วยวิธี One-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ Primer ทดสอบจำนวน 2 ชุด คือ OIE Marker (OIE, 2003) และ CUVET_Taura ซึ่งพัฒนาจากงานวิจัยนี้เพื่อใช้ในการหาสายพันธุ์ไวรัส ตรวจโรค White spot syndrome ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Commercial test kit (Centext®) ผลการตรวจโรคในกุ้งระยะ Postlarvae และระยะเต็มวัย พบว่ากุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงสามารถติดโรคทั้งสองโรคและอาจตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในกุ้งป่วยตัวเดียวกัน นอกจากนี้ยังตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดปนเปื้อนในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้ง ใช้ CUVET_Taura Primer หาลำดับเบสของยีน VP1 ในผลิตภัณฑ์ PCR ของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome พบว่าเชื้อไวรัสที่ระบอบอยู่ในฟาร์ม เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของประเทศไต้หวันมากกว่าสายพันธุ์จากอเมริกาและเม็กซิโก การศึกษาแสดงถึงการเกิดโรค Taura syndrome ในกุ้งกุลาดำจากการติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ของประเทศไต้หวันและการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในน้ำ ซึ่งอาจแสดงถึงวิธีการแพร่กระจายของโรคภายในฟาร์ม

ภาควิชาอายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิติ.....
สาขาวิชาโรคสัตว์น้ำ	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2547	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4575571031: MAJOR AQUATIC ANIMAL DISEASES

KEYWORD: Taura syndrome/ White spot syndrome/ *Penaeus monodon*/ *Litopenaeus vannamei*

SUKANYA PHALITAKUL : MOLECULAR DIAGNOSIS OF TAURA SYNDROME AND WHITE SPOT SYNDROME IN CULTURED SHRIMPS: *Litopenaeus vannamei* AND *Penaeus monodon* . THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. JANENUJ WONGTAVATCHAI Ph.D., THESIS COADVISOR: NAREERAT VISESHAKUL Ph.D. AND ASSIT. PROF. MEENA SARIKAPUTI Ph.D. 101 pp. ISBN 974 - 17 - 6164 – 3

Among viral diseases of penaeid shrimp, Taura Syndrome Disease (TSD) of the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and White Spot Syndrome Disease (WSSD) of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) are at high prevalence. Both diseases cause mass mortality in the cultured shrimp and significant economic loss in shrimp exportation. In the attempt to find the sensitive and specific diagnosis for these diseases, the viral nucleic acid based method was implemented in this study. To survey the disease occurrences, 39 samplings of both pacific white shrimp and black tiger shrimp (n=640), from 4 provincial areas of Thailand were collected during the period of 11 months, September 2003 - July 2004. One-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (One-step RT-PCR) was applied to detect TSD, using OIE recommended primers. In addition, the currently invented CUVET_Taura primers were used to amplify the VP1 gene sequence of TSV. PCR was also employed for the detection of WSSV, using Centext[®] commercial primers. Based on the diagnostic procedures, the evidences of TSV and WSSV infection were detected in post larval and adult stages of pacific white shrimp and black tiger shrimp. Interestingly, the co-infection of TSV and WSSV were also observed in some individual samples. The VP1 gene sequence of TSV suggested that the Thai epidemic TSV was more genetically related to the Taiwanese strains rather than the South American strains. Nonetheless, the application of RT-PCR and PCR can detect TSV and WSSV contaminated in the water taken from the epidemic ponds. Here are the strong evidences of TSD in black tiger shrimp, associated with the Taiwanese related strain of TSV. The observation of TSV and WSSV in pond water suggests the possible means of disease transmission.

Department Veterinary Medicine

Student's signature.....

Field of study Aquatic Animal Diseases

Advisor's signature.....

Academic Year 2004

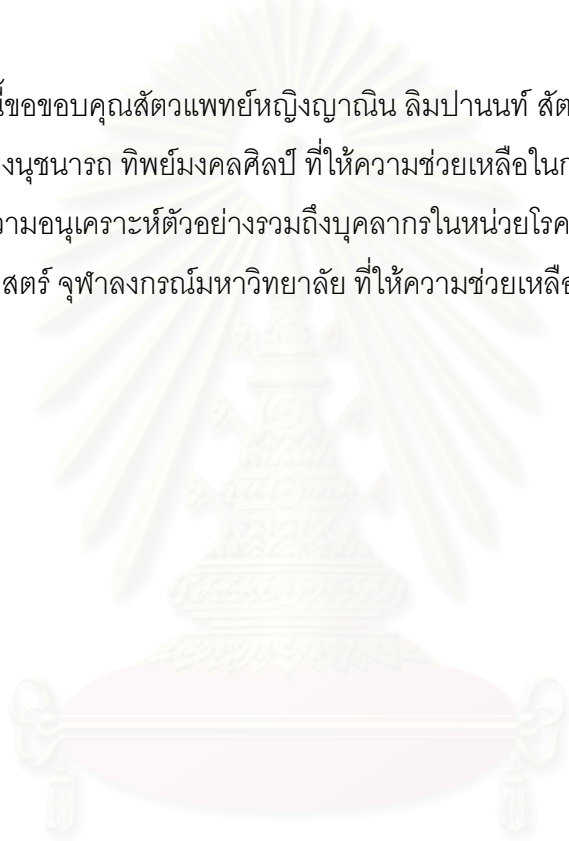
Co-advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจในการทำงานให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิงดร.เจนนุช ว่องธวัชชัย และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ได้แก่ สัตวแพทย์หญิงดร.นารีรัตน์ วิเศษกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิงดร.มีนา สาริกะภูติ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนความรู้ที่ให้การทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงรองศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน ที่ให้คำปรึกษาทางด้านสถิติ

นอกจากนี้ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิงญาณิน ลิมปานนท์ สัตวแพทย์หญิงณิธาวัน เจริญพร และสัตวแพทย์หญิงนุชนารถ ทิพย์มิ่งคลศิลป์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและคุณธัญธร ตระกูลเวียงที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างรวมถึงบุคลากรในหน่วยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4 |

2.1 แนวคิดและทฤษฎี.....	4
2.2 กุ้งกุลาดำ.....	4
2.2.1 ลักษณะกุ้งกุลาดำและถิ่นที่อยู่อาศัย.....	5
2.3 กุ้งขาว.....	6
2.3.1 ลักษณะกุ้งขาวและถิ่นที่อยู่อาศัย.....	7
2.4 Taura syndrome virus.....	7
2.4.1 คุณสมบัติของไวรัส.....	7
2.4.2 การระบาดของโรค Taura syndrome.....	8
2.4.3 Species ของกุ้งที่ติดโรค Taura syndrome.....	8
2.4.4 กลไกการเกิดโรค Taura syndrome.....	9
2.4.5 การแพร่กระจายของโรคสู่กุ้งที่เลี้ยงในบ่อ.....	9
2.4.5.1 Horizontal transmission.....	9
2.4.5.2 Vertical transmission.....	10
2.4.6 การติดโรค Taura syndrome.....	10
2.4.7 การวินิจฉัยโรค Taura syndrome.....	10

2.4.7.1	การตรวจจากอาการและลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ.....	10
2.4.7.2	การตรวจดูทางจุลพยาธิวิทยา.....	10
2.4.7.3	การตรวจดูเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	11
2.4.7.4	การตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยา.....	11
2.4.7.5	การตรวจสอบทางอณูชีววิทยา.....	11
2.5	White spot syndrome virus.....	13
2.5.1	คุณสมบัติของไวรัส.....	13
2.5.2	การระบาดของโรค White spot syndrome.....	13
2.5.3	Species ของกุ้งที่ติดโรค White spot syndrome.....	14
2.5.4	กลไกการเกิดโรค White spot syndrome.....	14
2.5.5	การแพร่กระจายของโรคสู่กุ้งที่เลี้ยงในบ่อ.....	14
2.5.5.1	Horizontal transmission.....	14
2.5.5.2	Vertical transmission.....	14
2.5.6	การติดโรค White spot syndrome.....	14
2.5.7	การวินิจฉัยโรค White spot syndrome.....	14
2.5.7.1	การตรวจจากอาการและลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ.....	15
2.5.7.2	การตรวจดูทางจุลพยาธิวิทยา.....	15
2.5.7.3	การตรวจดูเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	15
2.5.7.4	การตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยา.....	15
2.5.7.5	การตรวจสอบทางอณูชีววิทยา.....	15
2.6	การควบคุมป้องกันโรค Taura syndrome และ White spot syndrome.....	16
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1	วิธีการดำเนินการทดลอง.....	17
3.2	การตรวจโรค Taura syndrome.....	20
3.2.1	การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา.....	20
3.2.1.1	การเตรียมตัวอย่างทางจุลพยาธิวิทยา.....	20
3.2.1.2	ขั้นตอนในการทำ.....	20
3.2.2	การศึกษาทางอณูชีววิทยา.....	20
3.2.2.1	การสกัด RNA จากตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ.....	20
3.2.2.2	การสกัด RNA จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ.....	21
3.2.2.3	การสกัด RNA จากตัวอย่างสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ.....	21

3.2.2.4	ภาพแสดง DNA sequence ของโรค Taura syndrome21
	และตำแหน่งของ primer
3.2.2.5	การตรวจตัวอย่าง RNA จากตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ.....22
	น้ำเลี้ยง และสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ
3.2.2.6	การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ...22
3.2.2.7	การทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์.....23
3.2.2.8	การ clone ชิ้นส่วน DNA จากผลิตภัณฑ์ PCR.....23
3.2.2.9	การตรวจตัวอย่าง Plasmid DNA.....24
3.2.2.10	การตรวจสอบข้อมูลของลำดับเบสของเชื้อ Taura.....25
	syndrome
3.3	การตรวจโรค White spot syndrome.....25
3.3.1	การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา25
3.3.2	การศึกษาทางอณูชีววิทยา.....25
3.3.2.1	การสกัด DNA จากตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ.....25
3.3.2.2	การสกัด DNA จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ.....25
3.3.2.3	การสกัด DNA จากตัวอย่างสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ.....25
3.3.2.4	การตรวจตัวอย่าง DNA จากตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ.....26
	น้ำเลี้ยง และสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ
3.3.2.5	การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis ...26
บทที่ 4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....27
4.1	การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา.....32
4.2	การศึกษาทางอณูชีววิทยา.....36
4.2.1	ข้อมูลลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ Taura syndrome virus...41
4.2.2	การศึกษา Phylogenetic relationship.....47
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....49
5.1	สรุปผลการวิจัย.....49
5.2	อภิปรายผลการวิจัย.....49
5.3	ข้อเสนอแนะ.....53
	รายการอ้างอิง.....54
	ภาคผนวก.....61
	ภาคผนวก ก.....62

ภาคผนวก ข.....	65
ภาคผนวก ค.....	70
ภาคผนวก ง.....	74
ภาคผนวก จ.....	75
ภาคผนวก ฉ.....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	88



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	แสดงแผนงานวิจัย.....3
2.1	แสดงคุณสมบัติและลำดับเบสของ OIE Marker.....12
2.2	แสดงคุณสมบัติและลำดับเบสของ CUVET_Taura Marker.....12
3.1	แสดงข้อมูลของตัวอย่างกึ่งที่ทำการศึกษา.....18
4.1	สรุปการตรวจตัวอย่างกึ่งที่ทำการศึกษา.....27
4.2	ตารางเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ น้ำหนักกึ่งกับผลการตรวจวินิจฉัยโรคทางอณูชีววิทยา.....29
4.3	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนและผลการตรวจโรคของ...31 ตัวอย่างกึ่งที่เลี้ยงบ่อเดียวกันและฟาร์มเดียวกันในจังหวัดฉะเชิงเทราด้วยวิธี PCR ตรวจเมื่อวันที่ 1 และ 10 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2547
4.4	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10.....41 เดือนตุลาคม พ.ศ.2546 (ให้ชื่อว่า CLO_OCTcu)
4.5	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1.....41 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B4MAR01T)
4.6	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1.....42 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า BS5_TSV)
4.7	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1.....42 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B6MAR01_TSV)
4.8	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1.....43 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B8MAR01_TSV)
4.9	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1043 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS4_TSV)
4.10	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10.....44 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B5MAR10_TSV)
4.11	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10.....44 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า BS8_TSV)

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.12	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10.....45 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B8MAR10_TSV)
4.13	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดสมุทรสาคร ณ วันที่ 15.....45 เดือนพฤษภาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า PST_TSV)
4.14	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 13.....46 เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS5JUL13_TSV)
4.15	แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 13.....46 เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS8JUL13_TSV)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	แสดงลักษณะและส่วนต่างๆ ของกุ้ง.....6
4.1	แสดงลักษณะตัวอย่างกุ้งที่ทำการศึกษาวิจัย.....28
4.2	แสดงรอยโรคบนตัวกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส Taura syndrome.....33
4.3	แสดงจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส Taura syndrome.....34 เมื่อย้อมด้วย hematoxylin–eosin stain
4.4	แสดงรอยโรคบนตัวกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส White spot syndrome.....35
4.5	แสดงจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส White spot syndrome.....35 เมื่อย้อมด้วย hematoxylin–eosin stain
4.6	แสดงรอยโรคบนตัวกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อทั้ง Taura syndrome และ.....36 White spot syndrome
4.7	แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี RT-PCR ในการตรวจโรค Taura.....37 syndrome
4.8	แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี PCR ในการตรวจโรค White spot syndrome.....38 จากตัวอย่างกุ้ง
4.9	แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี RT-PCR ในการตรวจโรค Taura syndrome และ.....39 แถบ DNA จากวิธี PCR ในการตรวจโรค White spot syndrome
4.10	แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี RT-PCR ในการตรวจโรค Taura syndrome.....40 ในน้ำเลี้ยง
4.11	แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี PCR ในการตรวจโรค White spot syndrome.....40 ในน้ำเลี้ยง
4.12	แสดง Phylogenetic tree (Neighbor joining tree) และbootstrap number ที่กิ่งของ...48 ต้นไม้ แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ Taura syndrome ในตัวอย่างกุ้งที่ทำการศึกษา ครั้งนี้กับสายพันธุ์อื่นๆ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของส่วน VP1 ของเชื้อไวรัส Taura syndrome ที่มีขนาด 327 bp

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างมากต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากมีผลผลิตส่งออก ทั้งในรูปผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งและกุ้งแปรรูปในแต่ละปี ประมาณ 0.3 ล้านตันต่อปี (สิริ, 2545) มีมูลค่าการส่งออกปีละ 50,000 ถึง 70,000 ล้านบาท แต่นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 เป็นต้นมา ประเทศไทยเริ่มประสบปัญหาในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างต่อเนื่อง ทั้งปัญหาเรื่องโรคระบาดที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง ส่งผลให้มีการระงับการนำเข้า เพื่อป้องกันมิให้เกิดการแพร่กระจายของโรคไปยังส่วนต่างๆของโลก ซึ่งโรคในกุ้งจะถูกกำหนดโดยองค์การเฝ้าระวังโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (The Office International des Epizootics, OIE) เพื่อใช้ในการควบคุมและป้องกันโรคที่เกิดขึ้นในสัตว์ เพื่อจำกัดการแพร่กระจายของโรค ดังนั้นจึงมีการกวดขันการนำเข้ากุ้งไทยอย่างเข้มงวดจากต่างประเทศ จนอาจถึงขั้นระงับการนำเข้าได้ซึ่งโรคระบาดที่เกิดขึ้นแล้ว ก่อให้เกิดความสูญเสียอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

โรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัสเป็นส่วนใหญ่ พบว่าโรค White spot syndrome เป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย นอกจากนี้ยังรวมถึงปัญหาเรื่องการตลาด โดยตลาดกุ้งกุลาดำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา เนื่องจากมีการแข่งขันมากทางด้านราคาตลาดในการส่งออก รวมถึงมาตรการในการนำเข้ากุ้งไทยของประเทศไทยต่างๆที่มีการเข้มงวดในการตรวจคุณภาพกุ้งที่นำเข้าว่าต้องปลอดจากโรคและปัญหากุ้งโตช้า ไม่ได้ราคา นอกจากนี้ประเทศไทยยังประสบปัญหาเรื่องสารตกค้างในผลิตภัณฑ์กุ้งกุลาดำส่งออก ทำให้มีปัญหาในการส่งออกไปยังต่างประเทศอีกด้วย (สมปอง, 2545)

เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำบางส่วนมีการปรับเปลี่ยนการเลี้ยง โดยนำกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) เข้ามาเลี้ยงทดแทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เนื่องจากเชื่อว่ากุ้งขาวมีความทนทานต่อโรคระบาดได้มากกว่าและมีอัตราการเจริญเติบโตได้ดีกว่ากุ้งกุลาดำ เป็นที่ต้องการของตลาด มีผลผลิตที่สม่ำเสมอ โตเร็ว และเลี้ยงได้ตลอดทั้งปี เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศคู่แข่งอื่นๆ ด้วยสาเหตุนี้จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ Taura syndrome virus ซึ่งเป็นโรคไวรัสที่สำคัญในกุ้งขาว เข้ามาก่อให้เกิดความเสียหายแก่กุ้งที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากุ้งขาวสามารถติดเชื้อไวรัส White spot syndrome ได้เช่นเดียวกับกุ้งกุลาดำ (Lotz and Soto, 2002)

ในส่วนของโรคกุ้งที่ OIE กำหนดไว้ในมาตรการการเฝ้าระวังโรคระบาดสัตว์น้ำระหว่างประเทศ คือ Taura syndrome virus(TSV) White spot syndrome virus(WSSV) Yellow head virus(YHV) Tetrahedral baculovirus Spherical baculovirus Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis(IHHN) (OIE, 2003) โดย Taura syndrome virus เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากเป็นอันดับหนึ่งในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวตามแถบอเมริกา เช่น ประเทศเอกวาดอร์ สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก เปรู เป็นต้น มีมูลค่าการสูญเสียถึง 100 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Brock *et al.*,1995) ส่วน White spot syndrome virus เป็นโรคที่ก่อความเสียหายอย่างมากเป็นอันดับหนึ่งในกุ้งหลายสายพันธุ์ทั่วเอเชีย โดยเฉพาะในประเทศไทยที่เคยมีการระบาดของโรคนี้ในกุ้งกุลาดำในปี ค.ศ. 1997 มีมูลค่าความเสียหายถึง 600 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Chanratchakool and Phillips, 2002)

วิธีการตรวจวินิจฉัย Taura syndrome และ White spot syndrome มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การตรวจดูจากอาการ (clinical signs) การตรวจลักษณะรอยโรคของกุ้งที่ติดเชื้อ (gross lesions) การตรวจดูเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) การศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) การตรวจสอบโดยวิธีการทางภูมิคุ้มโนวิทยา (immunology) และ การตรวจสอบทางอณูชีววิทยา (molecular diagnosis) ด้วยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ใน Taura syndrome และ วิธี polymerase chain reaction (PCR) ใน White spot syndrome (Lightner and Redman, 1998) โดยวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยานั้น เป็นวิธีที่กำหนดโดย OIE ในการตรวจวินิจฉัยโรคทั้ง Taura syndrome และ White spot syndrome โดยถูกกำหนดเป็นทั้งการใช้ screening, presumptive และยืนยันผลการตรวจ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ใช้เวลาในการตรวจไม่นาน โดยวิธีนี้อาจเป็นทางเลือกในการตรวจพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ หรือนำมาจากทะเล เพื่อป้องกันมิให้เกิดการแพร่กระจายของโรคในลูกกุ้งที่เพาะเลี้ยงรุ่นต่อไปได้ ทำให้ลดความสูญเสียที่อาจเกิดขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เป็นการดำเนินการตรวจวินิจฉัยโรค Taura syndrome และ White spot syndrome ตามที่ได้ระบุไว้ใน OIE

1.2.2 เป็นการพัฒนากิจการตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส Taura syndrome

1.2.3 เป็นการตรวจโรค Taura syndrome และ White spot syndrome ทางอณูชีววิทยาในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ตรวจจับตัวอย่างทั้งกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำในระยะ Postlarvae และเต็มวัย จากฟาร์มเพาะเลี้ยงที่ส่งตัวอย่างมาตรวจ และ อนุญาตให้เข้าไปเก็บตัวอย่างมาตรวจได้เป็นระยะเวลาอย่างน้อยประมาณ 6 เดือน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อบันทึกเป็นข้อมูลว่ากุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย มีการติดโรค Taura syndrome

1.4.2 เพื่อใช้ข้อมูลการเกิดโรค เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดโรค Taura syndrome ในอนาคตมิให้เกิดการแพร่กระจายของโรคนี้ในประเทศไทย

1.4.3 เป็นขั้นตอนแรกในการเฝ้าระวังโรคว่า กุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงมีขบวนการเกิดโรค White spot syndrome ได้ในลักษณะเดียวกันกับกุ้งกุลาดำ

1.4.4 ในกรณีตรวจพบการเกิดโรค Taura syndrome ในประเทศไทย ทำให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อ Taura syndrome ว่ามาจากสายพันธุ์ใด เพื่อเพิ่มมาตรการในการป้องกันโรคได้ถูกต้อง

1.5 วิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาเป็นเวลาประมาณ 14 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2546 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2547(ตารางที่1.1)

ตารางที่1.1 แสดงแผนงานวิจัย

เดือนที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
พ.ศ. 25.....	46	46	46	46	46	46	47	47	47	47	47	47	47	47
เดือน	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
1.ทบทวนเอกสาร	*													
2.วางแผนการวิจัย		*	*											
3.ดำเนินการทดลอง			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4. วิเคราะห์และแปลผล												*	*	
5. เขียนรายงาน												*	*	*

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

โรค Taura syndrome และ White spot syndrome จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้ง โดยโรคทั้งสองก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำทั่วโลก โดยโรค Taura syndrome จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อกุ้งขาว ส่วนโรค White spot syndrome เป็นโรคระบาดในกุ้งกุลาดำที่สำคัญ Taura syndrome เกิดจากเชื้อ Taura syndrome virus เป็นผลให้เกิดการระบาดและตายจำนวนมากในกุ้งขาวในทวีปอเมริกา (Brock *et al.*, 1995) ส่วนโรค White spot syndrome เกิดจากเชื้อ White spot syndrome virus เป็นผลให้เกิดการระบาดแล้วก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากทั้งในกุ้งกุลาดำ และสายพันธุ์อื่นทั่วทั้งเอเชีย ตลอดจนจนถึงทวีปอเมริกา (Chanratchakool and Phillips, 2002; Rodriguez *et al.*, 2003) โดยในปัจจุบันยังไม่มียา และสารเคมีชนิดใดที่สามารถรักษาอย่างได้ผล ดังนั้นการป้องกันโรคจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่ใช้ในการป้องกันการแพร่กระจายของโรคได้ ฉะนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและมีความจำเพาะสูง เป็นวิธีการสำคัญที่สามารถใช้ป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้

ในการตรวจวินิจฉัยโรคทั้งสองโรค ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาในพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่นำเข้ามาเลี้ยงในประเทศ ว่าปลอดจากโรค รวมถึงการตรวจลูกกุ้งที่นำเข้ามาเลี้ยงในฟาร์มซ้ำอีกครั้ง ล้วนเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ป้องกันการเกิดโรคได้เป็นอย่างดี

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2 กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

กุ้งกุลาดำ หรือชื่อสามัญว่า Giant black tiger shrimp มีชื่อเรียกตามองค์การอาหารและเกษตรกรรมแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of United Nation, FAO) ว่า Giant tiger prawn (Solis, 1988) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* (*P. monodon*) ดังอนุกรมวิธาน

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Subclass Eumalacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Dendrobranchiata

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

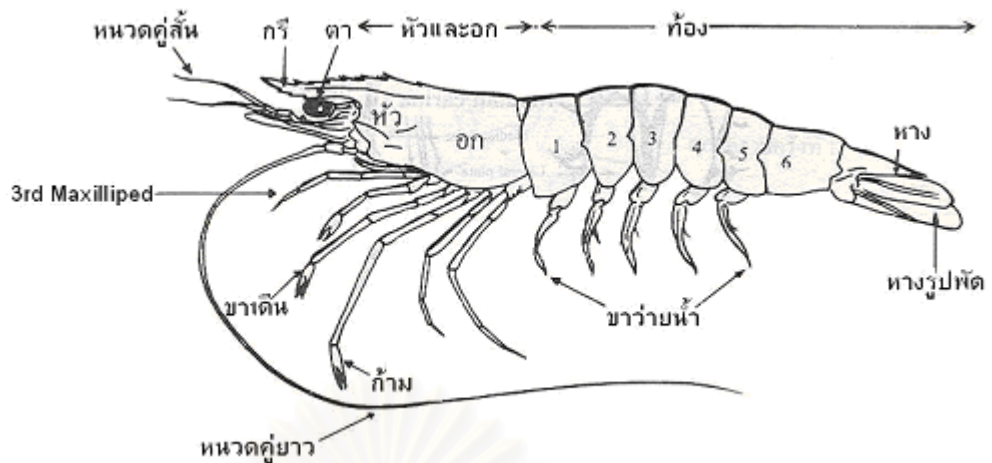
Genus Penaeus

2.2.1 ลักษณะกุ้งกุลาดำและถิ่นที่อยู่อาศัย

มีขนาดยาวประมาณ 330 มิลลิเมตรเมื่อโตเต็มที่ โดยลำตัวของกุ้งกุลาดำมีแถบสีดำพาดสลับขวางกับแถบนำเงิน หรือสีเขียวอ่อน ลำตัวเป็นปล้องๆ ประมาณ 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์หนึ่งคู่ ลำตัวของกุ้งแบ่งออกเป็นสามส่วนใหญ่ ได้แก่ หัว ออกและลำตัว(รูปที่ 2.1) ส่วนหัวมีห้าปล้อง แต่รวมเป็นปล้องเดียว มีเปลือกคลุม เปลือกหุ้มตัวของปล้องที่หนึ่ง จะยื่นเป็นพื้นแหลมไปข้างหน้า เรียกว่า กะโหลก มีตาหนึ่งคู่ ปากกุ้งอยู่ระหว่างขากรรไกร ส่วนหัวมีระยางค์ห้าคู่ สองคู่แรกเป็นหนวด ใช้ในการสัมผัส ระยางค์คู่ที่สามเป็นขากรรไกรล่าง มีหน้าที่ในการขบเคี้ยวอาหาร ส่วนคู่ที่สี่และคู่ที่ห้าเป็นขากรรไกรบน พื้นกะโหลกด้านบนมี 7 – 8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ร่องข้างกะโหลกทั้ง 2 ด้าน มีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงพื้นกะโหลกสิ้นสุดท้าย (วัลลภ, 2534)

ส่วนอกมีแปดปล้องโดยระยางค์คู่ที่ 6, 7 และ 8 อยู่บนอก เรียกว่า maxillipeds มีหน้าที่ในการช่วยกินอาหาร ส่วนระยางค์คู่ที่ 9, 10 และ 11 เป็นก้าม ก้ามแต่ละคู่มีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกุ้งทะเลใน Family Penaeidae โดยระยางค์ทั้งสามคู่นี้ มีหน้าที่ในการจับฉวยอาหารเข้าปาก หรือใช้ป้องกันตัว ส่วนระยางค์คู่ที่ 12 และคู่ที่ 13 เป็นขาใช้สำหรับเดิน เคลื่อนไหว และทำความสะอาดตัว

ส่วนลำตัวมีหกปล้อง ระยางค์คู่ที่ 14, 15, 16, 17 และ 18 มีลักษณะคล้ายใบพาย ใช้สำหรับว่ายน้ำ โดยโคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้องๆ หนวดมีสีดำ ไม่มีลาย ส่วนระยางค์คู่ที่ 19 เป็นแพนหาง



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะและส่วนต่างๆ ของกุ้ง (บวรจง, 2530)

กุ้งกุลาดำ มีถิ่นอาศัยอยู่ตั้งแต่บริเวณมหาสมุทรแปซิฟิก ทะเลแดง อ่าวอาหรับ ชายฝั่งอินเดีย มาเลเซีย จนถึงทางเหนือของออสเตรเลีย และญี่ปุ่น กุ้งชนิดนี้อาศัยอยู่ในโคลน หรือทราย (กระทรวงเกษตร, 2512) สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูง และความเค็มต่ำได้ เช่น บริเวณป่าชายเลน

กุ้งกุลาดำ นับเป็นกุ้งที่มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงในประเทศไทย เนื่องจากกุ้งกุลาดำเป็นสินค้าการเกษตรที่ได้รับความนิยมบริโภคจากทั่วโลก ทำให้มีความต้องการในปริมาณที่มากขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นกุ้งกุลาดำจึงเป็นสายพันธุ์ที่เกษตรกรไทยให้ความสนใจและมีการเพาะเลี้ยงเพื่อการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ มีมูลค่าการส่งออกในแต่ละปีสูงถึง 50,000 ถึง 70,000 ล้านบาท โดยมีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายกระจายอยู่ตามภาคต่างๆทั่วประเทศ ซึ่งมีทั้งการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำเค็ม และน้ำกร่อย โดยในการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำเค็ม มีการเลี้ยงที่บริเวณตามชายฝั่งของประเทศ ส่วนน้ำกร่อย เลี้ยงในพื้นที่ที่ไม่มีทางติดต่อกับทะเล โดยจังหวัดที่มีการเลี้ยง ได้แก่ จันทบุรี ระยอง ตราด ฉะเชิงเทรา สุราษฎร์ธานี เป็นต้น (ประจวบ, 2533)

2.3 กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

กุ้งขาว หรือชื่อสามัญที่เรียกว่า Pacific white shrimp มีชื่อเรียกตามองค์การอาหารและเกษตรกรรมแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of United Nation, FAO) ว่า Whiteleg shrimp โดยตั้งแต่ปี ค.ศ.1997 Isabel Perez Farfante และ Brian Kensley ได้มีการตั้งชื่อใหม่จาก *Penaeus vannamei* เป็น *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*) (Elovaara, 2001) ดังอนุกรมวิธาน

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Subclass Eumalacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Dendrobranchiata

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

Genus Litopenaeus

2.3.1 ลักษณะกุ้งขาวและถิ่นที่อยู่อาศัย

เป็นสายพันธุ์ในกลุ่มกุ้งขาวแปซิฟิก มีลำตัวสีขาว โดยมีรูปร่างและลักษณะคล้ายกับกุ้งแชบ๊วยโดยเฉพาะในระยะกุ้ง postlarvae มีพื้นที่ด้านบนและด้านล่างของปาก อาศัยตามโคลน มีความลึกประมาณ 72 เซนติเมตร โดยปกติกุ้งขาวไม่มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชีย ดังนั้น การศึกษาโรคของกุ้งขาวในแถบทวีปเอเชียยังขาดข้อมูลอีกมาก การเพาะเลี้ยงกุ้งขาว จะมีการเพาะเลี้ยงกันมากในแถบอเมริกากลางและใต้ เช่น สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก กัวเตมาลา นิคารากัว ปานามา โคลัมเบีย เอกวาดอร์ คอสตาริกา ฯลฯ กุ้งสายพันธุ์นี้เป็นสัตว์ที่มีความแข็งแรงและทนทานจึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้ไกลในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่เม็กซิโกถึงเปรู (Elovaara, 2001) ในการเพาะเลี้ยงกุ้งขาว ประเทศเอกวาดอร์เป็นประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ที่มีฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง ทั้งลูกกุ้งและพ่อแม่พันธุ์

2.4 Taura syndrome virus

2.4.1 คุณสมบัติของไวรัส

เชื้อ Taura syndrome virus จัดอยู่ใน Family Picornaviridae (Bonami *et al.*, 1997; Brock *et al.*, 1995) แต่ในเร็ววันนี้ ไวรัสนี้ได้จัดอยู่ใน Genus Cricket paralysis-like virus เนื่องจากพบว่าโครงสร้างจีโนม (Genome) ของไวรัสนี้คล้ายกับ RNA virus ที่ติดเชื้อในแมลง (Mari *et al.*, 2002) ไวรัสนี้มีขนาด 30 ถึง 32 นาโนเมตร มีลักษณะเป็น nonenveloped icosahedral particle ที่มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.338 ± 0.001 กรัม/มิลลิลิตร ส่วน genome เป็น single

molecule ของ ss RNA virus ซึ่งมีความยาวประมาณ 9 kb (Bonami *et al.*, 1997) โดยมีลำดับเบสทั้งหมด 10,205 base pair (Accession number NC003005/gi:14780876) (Mari *et al.*, 2002) และมี poly – A tail ที่ปลาย 3' ของ RNA โมเลกุล Genome ของไวรัสมี 2 open reading frame (ORF) โดยที่ ORF1 ประกอบด้วยยีนที่ไม่เกี่ยวกับโครงสร้างของไวรัส หรือ non – structural genes 3 ชนิด ที่ถอดรหัสเป็นยีน helicase, protease และ RNA – dependent RNA polymerase ส่วน ORF2 ประกอบด้วย structural genes ที่ถอดรหัสเป็นยีน viral capsids ประกอบด้วย 3 major polypeptide ได้แก่ VP1, VP2 และ VP3 (เท่ากับ 55 , 40 , 24 กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับ) และ 1 minor polypeptide คือ V0 (58 kDa) ส่วนของ VP1 ใช้ในการตรวจแยกสายพันธุ์ของ Taura syndrome ว่าเป็นสายพันธุ์ใด (Bonami *et al.*, 1997; Erickson *et al.*, 2002) ซึ่งในการปรับเปลี่ยนพันธุกรรม พบในส่วนของ Structural protein หรือ viral protein (VP) และอาจเกิดการกลายพันธุ์ในส่วน of VP นี้ได้ ทำให้การติดโรครุนแรงมากขึ้นได้

2.4.2 การระบาดของโรค Taura syndrome

Taura syndrome เป็นโรคที่พบการระบาดครั้งแรก เมื่อเดือนมิถุนายน ในปี ค.ศ.1992 จากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งบริเวณใกล้ปากแม่น้ำทอรา (Taura river) อำเภอควายาคิว (Guayaquil) ในประเทศเอกวาดอร์ (Brock *et al.*, 1995; Lightner *et al.*, 1995) โรคนี้ทำให้อุตสาหกรรมกุ้งขาวติดเชื้อป่วย และตาย โดยมีอัตราการตายประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ถึงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ มีมูลค่าการสูญเสียสูงถึง 100 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (Zarain-Herzberg, 2003) หลังจากนั้นในปี ค.ศ.1995 พบว่ามี การระบาดของโรค Taura syndrome ไปยังหลายประเทศทั้งในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ตั้งแต่ประเทศสหรัฐอเมริกา เม็กซิโก (Morales-Covarrubias and Chavez-Sanchez, 1999) เอกวาดอร์ เปรู โคลัมเบีย และ ฮาวาย (Brock *et al.*, 1997; Lotz, 1997) โดยทำให้มีอัตราการตายถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในปี ค.ศ. 1999 พบการระบาดในกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงที่ประเทศไต้หวัน (Yu and Song, 2000) และสาธารณรัฐประชาชนจีน เนื่องมาจากการนำเข้ากุ้งที่ติดโรคจากอเมริกา และในช่วงระหว่างปี ค.ศ.1999 ถึง 2000 พบการระบาดของโรค Taura syndrome สายพันธุ์ใหม่ที่ประเทศเม็กซิโก ทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในกุ้ง Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) ซึ่งเคยมีรายงานว่าทนต่อโรค Taura syndrome (Zarain-Herzberg and Ascencio - Valle, 2001)

2.4.3 Species ของกุ้งที่ติดโรค Taura syndrome

Taura syndrome virus เป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายจำนวนมากในกุ้งหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะในสายพันธุ์ Western Hemisphere ได้แก่ *Litopenaeus vannamei* *Penaeus*

stylirostris และ *Penaeus setiferus* โดย *L. vannamei* มีความไวต่อโรค Taura syndrome มากกว่า *P. stylirostris* (Gabriel and Felipe, 2000) นอกจากนี้ยังสามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งเหล่านี้ได้โดยการทดลอง ได้แก่กลุ่มกุ้งขาวสายพันธุ์ Western Hemisphere คือ *P. aztecus* และ *P. duodarum* และสายพันธุ์ Eastern Hemisphere คือ *P. chinensis*, *P. monodon* และ *P. japonicus* (Brock et al., 1997; Lightner, 1996)

2.4.4 กลไกการเกิดโรค Taura syndrome

เชื้อไวรัสจะติดเชื้อที่เซลล์เนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดจาก ectoderm และ mesoderm และเพิ่มจำนวนที่ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดยแบ่งการติดเชื้อของ Taura syndrome ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) ได้เป็น 3 ระยะ คือ acute phase, transitional phase และ chronic phase โดยในระยะ acute phase กุ้งที่ติดเชื้อไวรัส กินอาหารลดลง พบลำไส้ว่างเปล่า เปลือกอ่อนนิ่ม เนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อที่ชั้น cuticular epithelium ทำให้กุ้งเข้าสู่การลอกคราบ (molt cycle) ระยะ D stage ช้าลง อาจพบกุ้งตายในระยะการลอกคราบ นอกจากนี้ยังพบเซลล์เม็ดสีแดง (red chromatophore) ที่ชั้นใต้ผิวหนังในกุ้งที่ติดเชื้อ ทำให้บริเวณแพนหางและส่วน pleopods มีสีแดง ทำให้เรียกโรคนี้ว่า โรคหางแดง (red tail disease) (OIE, 2003) ส่วนในระยะ transitional เป็นระยะที่กุ้งบางส่วนที่รอดจากการตายในระยะ acute phase พบว่ากุ้งเริ่มมีจุดสีน้ำตาลที่เปลือก (melanized cuticular) ซึ่งเกิดมาจากการสะสมของฮีโมซัยต์ (haemocyte) ที่ชั้น cuticular epithelium โดยที่กุ้งในระยะนี้อาจพบ หรือไม่พบแพนหางแดงก็ได้ หรือ ไม่พบเปลือกนิ่มได้ แต่ยังคงกินอาหารได้เป็นปกติ หลังจากนั้นกุ้งในระยะ transitional phase ที่สามารถลอกคราบได้ เข้าสู่ระยะ chronic phase เชื้อไวรัสจะอยู่ที่ lymphoid organ ซึ่งกุ้งเหล่านี้เป็นพาหะให้แก่กุ้งตัวอื่นที่เลี้ยงในบ่อเดียวกันได้ ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 3 ถึง 5 วัน จะพบว่ากุ้งเริ่มตาย (Song et al., 2003)

2.4.5 การแพร่กระจายของโรคสู่กุ้งที่เลี้ยงในบ่อ

แบ่งการแพร่กระจายของโรค ได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ

2.4.5.1 Horizontal transmission เกิดจากการทำร้ายกัน หรือกินเนื้อกันเอง หรือซากกุ้งที่ติดโรคในบ่อเลี้ยง หรือติดจากการอยู่ร่วมกันกับตัวที่เป็นโรค โดยเชื้อไวรัส Taura syndrome สามารถติดต่อผ่านน้ำในบ่อ และอุปกรณ์ที่เลี้ยงได้ นอกจากนี้ยังพบว่าอาจติดจากอุจจาระของนกที่กินกุ้งที่ติดเชื้อได้ โดยเชื่อว่าถ้ากุ้งที่ติดเชื้อ มีขนาดมากกว่า 1 กรัม ทำให้นก

สามารถเห็น และบินมาโฉบกินได้ หลังจากนั้นนั้นปล่อยอุจจาระไปยังบ่ออื่นๆ ที่มีการเลี้ยงกุ้งได้ (Brock *et al.*, 1995; Garza *et al.*, 1997; Lightner, 1996)

2.4.5.2 Vertical transmission เกิดจากการติดต่อกันจากพ่อแม่ที่เป็นโรค ผ่านสู่ไข่ กุ้งและการฟักไข่

2.4.6 การติดโรค Taura syndrome

โดยทั่วไป การติดโรค เกิดในกุ้งวัยอ่อน ที่มีน้ำหนักประมาณ 0.1 ถึง 0.5 กรัม (10,000 ตัว/ กิโลกรัม ถึง 2,000ตัว/กิโลกรัม) หรือในช่วงระยะ Postlarvae ที่ 12 (OIE, 2000)

2.4.7 การวินิจฉัยโรค Taura syndrome

การวินิจฉัยโรค Taura syndrome ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจจากอาการ (clinical signs) และลักษณะรอยโรคของกุ้งที่ติดเชื้อ (gross lesions) การตรวจดูทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) การตรวจดูเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) หรือ การตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยา (immunology) และการตรวจสอบทางอณูชีววิทยา (molecular diagnosis)

2.4.7.1 การตรวจจากอาการ และลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ (Clinical signs and gross lesions)

ทำการศึกษาจากลักษณะอาการของกุ้งที่แสดงออกร่วมกับรอยโรค โดยแบ่ง อาการและรอยโรคได้เป็น 3 ระยะใหญ่ คือ ระยะ acute phase, transitional phase และ chronic phase โดยในระยะ acute กุ้งที่ติดเชื้อกินอาหารลดลง เปลือกอ่อนนึ่ม พบแพนหางแดง และส่วน pleopods มีสีแดง ส่วนในระยะ transitional พบจุดสีน้ำตาลที่เปลือก (melanized cuticular) และในระยะ chronic อาจพบจุดสีน้ำตาลที่เปลือกหรือไม่ก็ได้ เนื่องจากลอกคราบ ได้แล้ว

2.4.7.2 การตรวจดูทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

การตรวจดูทางจุลพยาธิวิทยา ทำให้ทราบระยะของการติดเชื้อ ว่าอยู่ในระยะใด ของการติดเชื้อ โดยเมื่อย้อมด้วย haematoxylin – eosin stain (H&E) พบลักษณะ multifocal necrosis ที่ cuticle epithelium ทั่วทั้งตัว รวมถึงส่วนระยางค์ทั้งหมด เหงือก ลำไส้ส่วนท้าย (hindgut) หลอดอาหาร (esophagus) และกระเพาะอาหาร (stomach) บางครั้งอาจพบเซลล์ติดเชื้อที่ชั้น subcuticular connective tissue และชั้น striated muscle fibers basal และ

พบ pyknotic nuclei และ cytoplasmic spherical inclusion bodies ซึ่งย้อมติดสี eosinophilic จนถึง darkly basophilic (Stern, 1995) โดยลักษณะรอยโรคแบบนี้ในระยะ acute เรียกว่า “Peppered” หรือ “Buckshot – riddle” ซึ่งเป็นวิการของโรค Taura syndrome โดยไม่พบการ infiltration ของ haemocyte (Brock *et al.*, 1995; Brock *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999) ส่วนในระยะ transitional พบการ infiltration ของ haemocyte จำนวนมาก โดยเห็นเป็นจุดดำที่เปลือก และในระยะ chronic พบ lymphoid organ spheroids จำนวนมาก (หรือที่เรียกว่า LOSs) (Hasson *et al.*, 1999)

2.4.7.3 การตรวจดูเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron Microscopy)

พบอนุภาคของ Taura syndrome มีรูปร่างแบบ nonenveloped icosahedral เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 นาโนเมตร (Jimenez *et al.*, 2000) และมีความหนาแน่นเท่ากับ 1.331 ± 0.001 กรัม/มิลลิลิตร (Yu and Song, 2000)

2.4.7.4 การตรวจสอบทางภูมิคุ้มโนวิทยา (Immunology)

สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส Taura syndrome ด้วยวิธีภูมิคุ้มโนวิทยาได้หลายวิธี เช่น การทำ monoclonal antibodies หรือ ตรวจทาง Immunohistochem โดยตรวจสารต่างๆที่อยู่ในฮีโมลิมพ์ (haemolymph) เช่น จำนวน haemocyte, hyalinocyte, granulocyte และค่า plasma protein จากการศึกษารายของ Song และคณะ(2003) พบว่าจำนวน haemocyte, hyalinocyte ,granulocyte และค่า plasma protein ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก haemocyte บางส่วนถูกทำลาย นอกจากนี้ plasma phenoloxidase (PO) activity มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

2.4.7.5 การตรวจสอบทางอณูชีววิทยา (Molecular diagnosis)

สามารถทำการวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาของโรค Taura syndrome ได้ด้วยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นการเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัสที่มีในปริมาณน้อย ให้มีปริมาณมากขึ้น จนสามารถตรวจสอบได้ โดยการนำเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อ หรือ haemolymph มาเพิ่มจำนวน cDNA โดยเปลี่ยน target RNA ให้เป็น cDNA ก่อนด้วย reverse transcriptase enzyme และใช้ Primer ที่จำเพาะกับปลาย 3' – ของ RNA หลังจากได้ cDNA จึงทำ PCR ตามขั้นตอนปกติ แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาแยกขนาด DNA โดยใช้ agarose gel electrophoresis แล้วนำมาย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR (Erickson *et al.*, 2002)

ในการตรวจสอบโรค Taura syndrome ใช้ Primer ทั้งหมด 2 ชุด ได้แก่ Primer 9195 และ 9992 และ Primer TSV_F1 และ TSV_R2 โดย Primer 9195 และ 9992 (ในที่นี่เรียก “OIE Marker”) เป็น Primer ที่ใช้ตรวจโรค Taura syndrome ในกุ้ง ตามที่มีระบุไว้ใน OIE Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals ในปี ค.ศ. 2003 Primer ชุดนี้มีลำดับเบส 231 base pair โดย Primer 9195 และ Primer 9992 มีตำแหน่ง nucleotide ที่ 7140 และ 6910 base pair ตามลำดับ (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติและลำดับเบสของ OIE Marker (OIE, 2003)

Primer	ลำดับเบส	Tm (°c)
9195	5'- TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	63
9992	5'- AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	69

หมายเหตุ : Tm หมายถึง melting point

ส่วน Primer TSV_F1 และ TSV_R2 (ในที่นี่เรียกว่า “CUVET_Taura Marker”) เป็น Primer ที่ผู้วิจัยออกแบบเอง โดยอยู่ในส่วนของยีน VP1 ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง nucleocapsid หุ้มไวรัส และเป็นส่วนที่ใช้ในการตรวจแยกสายพันธุ์ของ Taura syndrome ว่าเป็นสายพันธุ์ใด (Bonami *et al.*, 1997; Erickson *et al.*, 2002) Primer ชุดนี้มีลำดับเบส 370 base pair โดย Primer TSV_F1 และ Primer TSV_R2 มีตำแหน่ง nucleotide ที่ 8507 และ 8861 base pair ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติและลำดับเบสของ CUVET_Taura Marker

Primer	ลำดับเบส	Tm (°c)
TSV_F1	5'- CCA-GCG-NNN-GTT-GGG-TNC-AC-3'	62
TSV_R2	5'- ACC-GNG-TTC-NCC-NGG-CAG-TCC-3'	68

หมายเหตุ : N แทน A หรือ T

2.5 White spot syndrome virus

2.5.1 คุณสมบัติของไวรัส

เชื้อ White syndrome virus เดิมจัดอยู่ใน Family Baculovirus แต่ในปัจจุบันจัดอยู่ใน Family Nimaviridae (Mayo, 2002) Genus Whispovirus (van Hulten *et al.*, 2000) มีลักษณะเป็น double-stranded circular DNA ร่วมกับมี single filamentous appendage และมีเปลือกหุ้ม ไวรัสชนิดนี้มีขนาด 70 ถึง 150 นาโนเมตร x 270 ถึง 380 นาโนเมตร มีลักษณะเป็น rod shape (Lightner, 1999) โดย protein capsid ประกอบด้วย 5 major polypeptide คือ VP28, VP26, VP24, VP19 และ VP15 (เท่ากับ 28, 26, 24, 19 และ 15 kDa ตามลำดับ) ในปัจจุบันนี้มีรหัสสายพันธุกรรมครบทั้งจีโนมทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากสาธารณรัฐประชาชนจีน ประเทศไทย และ ไต้หวัน โดยมีลำดับเบสทั้งหมด 305,107 base pair (accession number NC003225/gi:17158105) 292,967 (accession number NC003225/gi:15021392) 307,287 (accession number NC003225/gi:19481591) ตามลำดับ ซึ่งประกอบด้วย 181 open reading frames (ORFs) (Yang *et al.*, 2001) 184 ORFs (van Hulten *et al.*, 2001) 531 ORFs (Tsai *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002) ตามลำดับ จากการศึกษาของ วรณสิกา และคณะ (2545) พบว่า โปรตีน VP28 และ VP19 เป็นโปรตีนที่ฝังตัวอยู่ในเปลือกหุ้มไวรัส (envelope) ส่วนโปรตีน VP26, VP24 และ VP15 เป็นโปรตีนในส่วนนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) โดยเชื่อว่า VP 28 และ VP 19 ทำหน้าที่ในการช่วยให้ไวรัสเกาะติดกับเซลล์ในตั๊กแตน และสามารถเข้าสู่ตั๊กแตนทำให้ตั๊กแตนป่วยและตายในที่สุด รวมทั้งยังอาจจะมีบทบาทที่เกี่ยวกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในตั๊กแตนอีกด้วย

2.5.2 การระบาดของโรค White spot syndrome

โรค White spot syndrome พบการระบาดครั้งแรกที่เอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี ค.ศ. 1992 ถึง 1993 แล้วก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงอย่างมากทั่วเอเชีย เช่น สาธารณรัฐประชาชนจีน ประเทศอินเดีย ไทย ญี่ปุ่น ไต้หวัน เกาหลี ฟิลิปปินส์ (Chanratchakool and Phillips, 2002; Magbanua *et al.*, 2000; Manivannan *et al.*, 2002; Zhan *et al.*, 1998) เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1995 พบว่ามีรายงานการระบาดครั้งแรกที่รัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา หลังจากนั้นพบรายงานการระบาดที่รัฐเซาท์แคโรไลนา ในปี ค.ศ. 1997 ถึง ค.ศ. 1998 (Lightner, 1999) และในปี ค.ศ. 1999 พบว่ามีรายงานการระบาดทางชายฝั่งตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา และประเทศเม็กซิโก

2.5.3 Species ของกุ้งที่ติดโรค White spot syndrome

การเกิดโรค White spot syndrome สามารถเกิดได้กับหลายสายพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็นกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) กุ้งขาวจีน (*P. chinensis*) (Zhan *et al.*, 1998) กุ้งแชบ๊วย (*P. merguensis*) (Wang *et al.*, 2002) กุ้งแชบ๊วยขาว (*P. indicus*) (Hameed *et al.*, 2002) กุ้งลายเสือ (*P. japonicus*) (SEAFDEC, 2002) กุ้งขาว (*P.vannamei*) (Rodríguez *et al.*, 2003) และ *P.merguensis* เป็นต้น หรือเกิดในสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น ในปูน้ำจืดสองชนิด (*Paratelphusa hydrodomous* and *Paratelphusa pulvinata*) (Hameed *et al.*, 2001)

2.5.4 กลไกการเกิดโรค White spot syndrome

เชื้อไวรัสทำลายเซลล์เนื้อเยื่อ ectoderm และ mesoderm ทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อที่ผิวหนังและกล้ามเนื้อ ทำให้รบกวนกระบวนการสร้างเปลือก เนื่องจากเซลล์ที่ชั้นผิวหนังถูกทำลายทำให้กระบวนการสร้างสารที่เปลือกผิดปกติไป แคลเซียมมาพอกได้เร็วกว่าปกติในบางส่วน ทำให้เกิดเป็นจุดที่ไม่เป็นระเบียบ พบว่ามีจุดขาวใต้ carapace ซึ่งสังเกตเห็นได้ชัดเจนตรงเปลือกส่วนหัวและอก และเมื่อเชื้อไวรัสเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อที่ทางเดินอาหาร ทำให้ระบบการย่อยและการดูดซึมเสียหายไป

2.5.5 การแพร่กระจายของโรคสู่กุ้งที่เลี้ยงในบ่อ

แบ่งการแพร่กระจายของโรค ได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ

2.5.5.1 Horizontal transmission การติดโรคนั้นเกิดจากติดเชื้อจากกุ้งป่วย การปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในน้ำและอุปกรณ์ที่ใช้เพาะเลี้ยง

2.5.5.2 Vertical transmission เกิดจากการติดต่อกับพ่อแม่ที่เป็นโรค

2.5.6 การติดโรค White spot syndrome

การติดโรค White spot syndrome มักเกิดในกุ้งช่วงท้ายของระยะ postlarvae และ juveniles (Yoganandhan *et al.*, 2003) รวมถึงการปล่อยกุ้งในช่วงอากาศเย็น คือประมาณเดือนพฤศจิกายน ถึง มกราคม

2.5.7 การวินิจฉัยโรค White spot syndrome

การวินิจฉัยโรค White spot syndrome ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจจากอาการ (clinical signs) และลักษณะรอยโรคของกุ้งที่ติดเชื้อ (gross lesions) การตรวจดูทางจุลพยาธิ

วิทยา (histopathology) การตรวจดูเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) หรือ การตรวจสอบทางภูมิคุ้มโนวิทยา (immunology) และการตรวจสอบทางอณูชีววิทยา (molecular diagnosis)

2.5.7.1 การตรวจจากอาการ และลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ (Clinical signs and gross lesions)

ทำการศึกษาลักษณะอาการของกุ้งที่แสดงออกร่วมกับบรอยโรค โดยพบว่ากุ้งกินอาหารลดลง ว่ายเกยขอบบ่อ และพบจุดขาวที่ได้ carapace หรือเปลือกไต้ลำตัว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิเมตร บางตัวอาจพบบริเวณปลายหาง ขาเดิน หรือขาว่ายน้ำ มีสีแดง

2.5.7.2 การตรวจดูทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

การตรวจดูทางจุลพยาธิวิทยา พบลักษณะ hypertrophied nuclei จากเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดมาจาก ectoderm and mesoderm ย้อมติดสี basophilic ตรงเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายด้วยไวรัส เมื่อย้อมด้วย haematoxylin – eosin stain (H&E) (Kasornchandra *et al.*, 1998)

2.5.7.3 การตรวจดูเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron Microscopy)

พบอนุภาคของ White spot syndrome มีรูปร่างแบบ rod shaped หรือ elliptical ไวรัสชนิดนี้มีขนาด 70 ถึง 150 นาโนเมตร x 270 ถึง 380 นาโนเมตร (Lightner, 1999)

2.5.7.4 การตรวจสอบทางภูมิคุ้มโนวิทยา (Immunology)

สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส White spot syndrome ด้วยวิธีภูมิคุ้มโนวิทยาได้หลายวิธี เช่น การทำ monoclonal antibodies โดยการนำผลิต monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อ White spot syndrome virus

2.5.7.5 การตรวจสอบทางอณูชีววิทยา (Molecular diagnosis)

สามารถทำการวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาของโรค White spot syndrome ได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและจำเพาะสูง โดยเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อไวรัสที่มีในปริมาณน้อย ให้มีปริมาณมากขึ้นในหลอดทดลอง จนสามารถตรวจสอบได้ โดยการนำเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อ หรือ haemolymph มาเพิ่มจำนวนได้ โดยใช้เอ็นไซม์ Taq polymerase และ Primer ที่จำเพาะกับ DNA ของเชื้อ White spot syndrome virus แล้วนำ

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ แยกขนาด DNA โดยใช้ agarose gel electrophoresis แล้วนำมาย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนนำไปตรวจดูภายใต้แสง UV หรือตรวจสอบด้วยวิธี *in situ* hybridization ในการหาตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ White spot syndrome โดยอาศัย DNA probe ที่จำเพาะ ติดฉลากด้วยสาร haptens เช่น biotin, digoxigenin, photobiotin และ acetylaminofluorence เป็นต้น แล้วตรวจหาสัญญาณหรือฉลากด้วยสารเรืองแสงอีกชั้นหนึ่งโดยการติดสารเรืองแสงไว้กับ specific antibodies ต่อ haptens นั้น หรือ สารที่มีคุณสมบัติพิเศษ เช่น streptavidin เป็นต้น (Wongteerasupaya *et al.*, 1996)

2.6 การควบคุมและป้องกันโรค Taura syndrome และ White spot syndrome

การติดเชื้อโรคไวรัสในกุ้งทำการรักษาได้ยาก ซึ่งยังไม่มียาหรือสารเคมีที่ใช้รักษาให้กุ้งที่ติดเชื้อแล้ว หายจากโรคได้ ดังนั้นการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคน่าเป็นวิธีที่เหมาะสมที่ป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของโรค ทำได้โดยการตรวจสอบลูกกุ้งตั้งแต่วัยอ่อนกว่ามีการติดเชื้อ Taura syndrome หรือ White spot syndrome หรือไม่ โดยเลือกซื้อลูกกุ้งที่มีความแข็งแรง และปลอดโรคจากโรงเพาะฟัก (Jory, 1999) แล้วเมื่อนำมาเลี้ยงในบ่อ ก็ไม่ควรเลี้ยงปนกันระหว่างกุ้งต่างสายพันธุ์เพราะเป็นการทำให้เกิดการแพร่ของโรคข้ามสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ในด้านการจัดการการเลี้ยงกุ้งในฟาร์มเป็นสิ่งสำคัญ เพราะต้องจัดการให้กุ้งที่เลี้ยงลดโอกาสที่จะเกิดโรค เช่น ลดพาหะของโรคให้หมดไป เช่น ปูม้า (*Portunus pelagicus*) ปูทะเล (*Scylla serrata*) และเคย (*Acetes* sp.) ที่เป็นพาหะของโรค White spot syndrome (Supamattaya *et al.*, 1997) หรือ นก ที่เป็นพาหะที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรค Taura syndrome (Garza *et al.*, 1997) ยังรวมถึงการบำบัดน้ำทุกครั้งหลังจากการเลี้ยงหรือการนำน้ำเข้าฟาร์ม และมีการตรวจคุณภาพน้ำในระหว่างการเลี้ยงทุกครั้ง นอกจากนี้ไม่ควรปล่อยลูกกุ้งที่หนาแน่นมากเกินไป เพราะจะทำให้กุ้งเครียดและติดโรคได้ง่าย (Jory, 1999)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการ

3.1 วิธีการดำเนินการทดลอง

ทำการเก็บตัวอย่างจากแหล่งที่คาดว่ามามีโรค White spot และ Taura syndrome โดยเก็บตัวอย่างกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในระยะ Postlarvae และระยะเต็มวัยอย่างน้อย 10 ตัว/บ่อในถุงพลาสติก sterilized ziplock[®] รวมถึงน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและสัตว์ที่อาจเป็นพาหะในฟาร์ม ทำเก็บรักษาตัวอย่างก่อนส่งตรวจในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) แล้วจึงนำมาเก็บไว้ที่ - 70 องศาเซลเซียส ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แบ่งตรวจตัวอย่างเป็น 2 ส่วน โดยตัวอย่างส่วนหนึ่งส่งตรวจทางอณูชีววิทยา และอีกส่วนตรวจทางจุลพยาธิวิทยา โดยมีระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง 11 เดือน นับตั้งแต่ เดือนกันยายน พ.ศ. 2546 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2547 (ตารางที่ 3.1)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 แสดงข้อมูลของตัวอย่างกุ้งที่ทำการศึกษา

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			น้ำหนักตัว(กรัม)		แหล่ง ตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	X ± SD	Range		
A 1.	Lv	40	10	3.25 ± 0.661	2.26 – 3.973	สมุทรสาคร	12 กันยายน 2546
2.	Lv	40	10	2.656 ± 0.651	1.747 – 3.579	สมุทรสาคร	12 กันยายน 2546
3.	Lv	40	10	2.188 ± 0.569	1.023 - 2.924	สมุทรสาคร	12 กันยายน 2546
4.	Lv	40	10	1.557 ± 0.545	1.121 – 2.529	สมุทรสาคร	12 กันยายน 2546
B 5.	Lv	35	10	2.599 ± 0.734	0.62 – 3.32	ฉะเชิงเทรา	10 ตุลาคม 2546
6.	Lv	35	10	1.02 ± 0.529	0.15 – 1.59	ฉะเชิงเทรา	10 ตุลาคม 2546
7.	Lv	35	10	2.39 ± 0.905	0.24 – 3.38	ฉะเชิงเทรา	10 ตุลาคม 2546
8.	Lv	35	10	2.208 ± 0.800	0.68 – 3.42	ฉะเชิงเทรา	10 ตุลาคม 2546
9.	Lv	35	10	2.364 ± 0.82	0.53 – 3.146	ฉะเชิงเทรา	10 ตุลาคม 2546
10.	Lv	35	10	2.524 ± 0.637	0.78 – 3.27	ฉะเชิงเทรา	10 ตุลาคม 2546
C 11.	Lv	60	20	6.44 ± 1.227	5.012 – 7.994	ชุมพร	13 พฤศจิกายน 2546
12.	Lv	60	20	6.285 ± 1.349	4.358 – 7.957	ชุมพร	13 พฤศจิกายน 2546
13.	Lv	60	20	6.094 ± 1.232	4.889 – 7.895	ชุมพร	13 พฤศจิกายน 2546
14.	Lv	60	20	6.053 ± 7.981	4.433 – 7.981	ชุมพร	13 พฤศจิกายน 2546
15.	Lv	60	20	6.366 ± 1.222	5.125 – 8.174	ชุมพร	13 พฤศจิกายน 2546
16.	Lv	60	20	7.008 ± 1.381	5.023 – 8.523	ชุมพร	13 พฤศจิกายน 2546
D 17.	Pm	20	20	0.551 ± 0.198	0.294 – 0.935	ตราด	1 กุมภาพันธ์ 2547
18.	Pm	20	20	0.507 ± 0.211	0.254 – 0.842	ตราด	1 กุมภาพันธ์ 2547
19.	Pm	30	20	2.217 ± 0.819	1.051 – 3.962	ตราด	1 กุมภาพันธ์ 2547
20.	Pm	100	20	13.312 ± 2.757	10.62 – 18.132	ตราด	1 กุมภาพันธ์ 2547
21.	Lv	30	20	1.485 ± 0.741	0.703 – 3.15	ตราด	1 กุมภาพันธ์ 2547

หมายเหตุ : ID หมายถึง Identification number
Pm หมายถึง *Penaeus monodon*
Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
X ± SD หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
□ ■ หมายถึง ชุดของการสุ่มตัวอย่าง

ตารางที่ 3.1 แสดงข้อมูลของตัวอย่างกุ้งที่ทำการศึกษา (ต่อ)

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			น้ำหนักตัว(กรัม)		แหล่ง ตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	X ± SD	Range		
E 22.	Lv	30	20	1.284 ± 0.473	0.11 - 2.42	ฉะเชิงเทรา	1 มีนาคม 2547
23.	Pm	50	20	1.568 ± 0.537	1.08 - 2.4	ฉะเชิงเทรา	1 มีนาคม 2547
24.	Pm	50	20	2.011 ± 1.096	0.29 - 3.62	ฉะเชิงเทรา	1 มีนาคม 2547
25.	Lv	40	20	1.678 ± 0.656	1.09 - 2.68	ฉะเชิงเทรา	1 มีนาคม 2547
26.	Pm	50	20	1.806 ± 0.539	1.14 - 3.19	ฉะเชิงเทรา	1 มีนาคม 2547
27.	Lv	40	20	2.569 ± 0.07	2.4 - 2.65	ฉะเชิงเทรา	1 มีนาคม 2547
F 28.	Lv	40	20	2.373 ± 0.599	1.05 - 3.35	ฉะเชิงเทรา	10 มีนาคม 2547
29.	Lv	40	20	2.849 ± 1.381	0.505 - 2.485	ฉะเชิงเทรา	10 มีนาคม 2547
30.	Pm	60	20	4.16 ± 1.444	2.31 - 6.27	ฉะเชิงเทรา	10 มีนาคม 2547
31.	Lv	50	20	4.795 ± 0.812	3.78 - 6.03	ฉะเชิงเทรา	10 มีนาคม 2547
32.	Pm	60	20	3.032 ± 1.685	1.067 - 5.896	ฉะเชิงเทรา	10 มีนาคม 2547
33.	Lv	50	20	3.891 ± 1.792	1.16 - 5.87	ฉะเชิงเทรา	10 มีนาคม 2547
34.	Pm	60	20	2.725 ± 0.925	1.4 - 5.2	ฉะเชิงเทรา	10 มีนาคม 2547
35.	Lv	50	20	3.76 ± 0.904	1.73 - 5.21	ฉะเชิงเทรา	10 มีนาคม 2547
G 36.	Lv	60	10	6.44 ± 1.227	5.012 - 7.994	สมุทรสาคร	15 พฤษภาคม 2547
H 37.	Lv	48	10	3.25 ± 1.937	0.456 - 4.994	ฉะเชิงเทรา	13 กรกฎาคม 2547
38.	Lv	48	10	2.688 ± 1.378	1.354 - 4.309	ฉะเชิงเทรา	13 กรกฎาคม 2547
39.	Lv	28	10	0.305 ± 0.362	0.121 - 1.201	ฉะเชิงเทรา	13 กรกฎาคม 2547

หมายเหตุ :

- ID หมายถึง Identification number
Pm หมายถึง *Penaeus monodon*
Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
X ± SD หมายถึง ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
□ ■ หมายถึง ชุดของการสุ่มตัวอย่าง

3.2 การตรวจโรค Taura syndrome

3.2.1 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

3.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างทางจุลพยาธิวิทยา

ฉีด Davidson's fixative เข้า haemolymph และกล้ามเนื้อของตัวอย่างกุ้งขาว และกุ้งกุลาดำที่เก็บมา ก่อนนำตัวอย่างกุ้งแช่ลงในน้ำยา Davidson's fixative

3.2.2 ขั้นตอนในการทำ

ทำการดองตัวอย่างกุ้งด้วย Davidson's Fixative เวลนานอย่างน้อย 1 วัน หลังจากนั้นตัดชิ้นเนื้อแล้วนำชิ้นเนื้อที่ได้ไปผ่านขบวนการ tissue processing โดยล้างชิ้นเนื้อด้วยน้ำผ่านขบวนการดึงน้ำออก (dehydration step) โดยใช้ alcohol ที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ จาก 70%, 80%, 95% และ 100% จากนั้นกำจัดน้ำให้สมบูรณ์ด้วย xylene และนำไปทำการฝังชิ้นเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน (paraffin embedding) นำ paraffin block มาตัด section ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (ultramicrotome) ขนาดประมาณ 3 – 4 ไมครอน นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดวางบนแผ่นสไลด์ (affixing) และผ่านขบวนการละลายพาราฟินออกจากแผ่นเนื้อเยื่อ (deparaffinization step) และขบวนการดึงน้ำกลับเข้าสู่เซลล์ (rehydration step) ก่อนย้อมด้วย hematoxylin–eosin stain (H&E) ปิดแผ่นเนื้อเยื่อด้วย cover glass (mounting step) แล้วนำไปตรวจศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic) ด้วยการเปรียบเทียบกับกุ้งปกติ

3.2.2 การศึกษาทางอณูชีววิทยา

3.2.2.1 การสกัด RNA จากตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ

ทำการสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp RNA blood Mini kit (QIAGEN®, USA) โดยนำเหงือกกุ้ง, เนื้อเยื่อโคนขา, lymphoid organ และเปลือกที่พบอาการของโรค(จุดดำ) น้ำหนักประมาณ 20 มิลลิกรัม มา homogenized ด้วย RLT (Lysis buffer ในชุดสกัดสำเร็จรูป) ด้วย sterilized hand homogenizer grinder (Pyrex®) จนละเอียด นำ lysate ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที (20,000g, Spectrafuge รุ่น 16M) เป็นเวลา 3 นาที นำส่วน supernatant ที่ได้ไปผ่าน QIAshredder spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วน supernatant ที่ผ่าน QIAshredder spin column ไปเติม 70% ethanol ปริมาณ 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำส่วนที่ได้ไปผ่าน QIAamp spin column จากนั้นล้างสิ่งปนเปื้อนบนแผ่นกรองด้วย RW1 buffer (ในชุดสกัดสำเร็จรูป) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที และเติม RPE buffer (ในชุด

สกัดสำเร็จรูป) 2 ครั้ง ครั้งละ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติม RNase – free water (QIAGEN®, USA) ประมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อ elute สาย RNA ที่อยู่บนแผ่นกรองออก แล้วนำ RNA ที่สกัดได้ไปเก็บที่ – 70 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ต่อไป

3.2.2.2 การสกัด RNA จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ

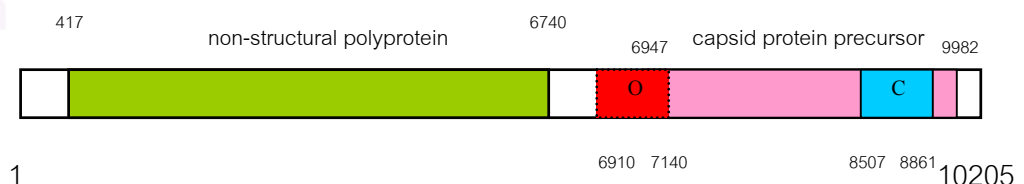
นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงจากบ่อกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำ filtrate และ ส่วนที่ติด filter membrane ไปสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp RNA blood Mini kit (QIAGEN®, USA) (อ้างอิงจากข้อ 3.2.2.1)

3.2.2.3 การสกัด RNA จากตัวอย่างสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ

นำสัตว์ที่สงสัยว่าเป็นพาหะจากบ่อกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ได้แก่ หนอนแดง หอยเจดีย์ และจิ้งจิกน้ำ มาอย่างละ 3 - 5 ตัว/บ่อ นำไปสกัด RNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp RNA blood Mini kit (QIAGEN®, USA) (อ้างอิงจากข้อ 3.2.2.1)

3.2.2.4 ภาพแสดง DNA sequence ของ Taura syndrome virus และตำแหน่งของ primer

Specific oligonucleotide primers ที่ใช้ใน RT-PCR amplification ในการวินิจฉัยโรค Taura มี 2 ชุด คือ OIE Marker ประกอบด้วย Primer 9195 และ 9992 (OIE, 2003) และ CUVET_Taura ประกอบด้วย Primer TSV_F1 และ TSV_R2 ซึ่ง Primer 9195 และมีตำแหน่ง nucleotide ที่ 7140 base pair และ Primer 9992 มีตำแหน่ง nucleotide ที่ 6910 base pair ตามลำดับ และได้ PCR product ขนาด 231 bp ส่วน Primer TSV-F1 มีตำแหน่ง nucleotide ที่ 8507 base pair และ Primer TSV-R2 มีตำแหน่ง nucleotide ที่ 8861 base pair และได้ PCR product ขนาด 370 bp โดยแสดงดังรูปต่อไปนี้



สัญลักษณ์ “ O ” แทน OIE Marker และ สัญลักษณ์ “ C ” แทน CUVET_Taura

3.2.2.5 การตรวจตัวอย่าง RNA จากตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ, น้ำเลี้ยง และสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ

นำ RNA ที่สกัดได้ปริมาณ 11 ไมโครลิตร / 1 ปฏิบัติ PCR โดยใช้ SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen[®], USA) และ specific oligonucleotide primers (OIE Marker และ CUVET_Taura) ซึ่งประกอบด้วย 2 X Reaction mix, 0.1mM forward primer, 0.1mM reverse primer, Template RNA, RT/Platinum Taq[®] Mix และ เต็ม sterile distilled water จนครบปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) แล้วนำเข้าเครื่อง Thermocycle (Perkin Elmer Cetus 9600, CA, USA) ตามโปรแกรมที่ได้ตั้งอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบไว้ดังนี้ คือ ในการสังเคราะห์ cDNA ใช้อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 1 รอบ) และ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที หลังจากนั้นเริ่มปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยกำหนดอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบไว้ดังนี้ คือ ขั้นตอนในการ denaturation ใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที และขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที ส่วนขั้นตอน extension ใช้อุณหภูมิที่ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยมีจำนวนรอบทั้งหมด 40 รอบ หลังจากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจหาด้วยวิธี gel electrophoresis

3.2.2.6 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ ไปวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel (ปริมาตร 25 มิลลิลิตร) ที่ผสมด้วย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Sigma[®], USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร/ agarose gel 50 มิลลิลิตร โดยนำ agarose gel ปริมาตร 1 กรัม ละลายใน 0.5 X TBE buffer โดยใช้ 100 bp DNA ladder (SibEnzyme[®], USA) เป็น marker เปรียบเทียบทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ loading buffer 2 ไมโครลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 37 นาที ใน 0.5 X TBE buffer แล้วนำ agarose gel ที่ได้ไปดูผลด้วย UV illuminator ซึ่งจะเห็นผลิตภัณฑ์จากการใช้ OIE marker ที่ขนาด 231 base pair และ CUVET_TAURA ที่ขนาด 370 base pair

3.2.2.7 การทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ตรวจสอบและให้ผลบวกกับเชื้อ Taura syndrome ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN[®], USA) โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ 20 ไมโครลิตรผสมร่วมกับ buffer PB (ในชุดสำเร็จรูป) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปผ่าน QIAquick spin column และล้างสิ่งปนเปื้อนที่ติดอยู่บนแผ่น membrane ด้วย buffer PE (ในชุดสำเร็จรูป) ปริมาณ 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ก่อน elute สาย DNA ที่อยู่บนแผ่น membrane ด้วย buffer EB ปริมาณ 20 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำ DNA ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ต่อไป

3.2.2.8 การ clone ชิ้นส่วน DNA จากผลิตภัณฑ์ PCR

- ขั้นตอนในการ ligate

ทำการ ligate DNA ที่บริสุทธิ์เข้ากับ pGEM – T Easy[®] Vector System I (Promega[®], USA) โดยนำ 2 X Rapid Ligation Buffer ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ร่วมกับ pGEM – T Easy[®] Vector ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร และผลิตภัณฑ์ PCR 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ pipette หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ บ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไป transform กับ competent cell (ECOS 101, USA)

- ขั้นตอนในการเตรียม Bacto[®] Luria Bertani agar ที่จะใช้ในการ clone DNA

นำ 100 mM Isopropyl - β - D - Thiogalactopyranoside (IPTG) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ 5 - Bromo - 4 - Chloro - 3 - Indolyl - β - D - Galactopyranoside (X- gal) (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ไป spread ลงบน Bacto[®] Luria Bertani agar ที่ผสม ampicillin ในปริมาณ 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำไปใช้

- ขั้นตอน transformation เข้าสู่ competent cell

นำ competent cell ผสมกับ ligate product แล้วนำไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และแช่ลงในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 – 3 นาที ก่อนนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacto[®] Luria Bertani agar ที่ผสม ampicillin, IPTG และ X- gal และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเห็นโคโลนี

- ขั้นตอนในการสกัด Plasmid DNA

1. นำโคโลนีสีขาวที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อใน Bacto[®] Luria Bertani agar ที่ผสม ampicillin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตรและนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. นำเชื้อ *E. coli* colony ไปเพาะเชื้อลงใน Bacto[®] Luria Bertani broth ที่ผสม ampicillin 100 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร และนำไปบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. สกัด plasmid DNA จากเชื้อ *E. coli* ที่ขึ้นใน Bacto[®] Luria Bertani broth ที่ผสม ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยชุดสกัด QIAprep[®] Miniprep Kit (QIAGEN[®], USA) โดยนำเชื้อ *E. coli* ที่ขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ มาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้น resuspend pellet bacteria cell ใน buffer P1 (ในชุดสกัดสำเร็จรูป) ปริมาณ 250 ไมโครลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม buffer P2 ปริมาณ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม buffer N3 ปริมาณ 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ว ปั่นเหวี่ยง ที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำ supernatant ที่ได้ผ่าน QIAprep spin column ล้างสิ่งปนเปื้อนด้วย buffer PB 500 ไมโครลิตร และ buffer PE 750 ไมโครลิตร หลังจากนั้น elute plasmid DNA ด้วย buffer EB ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เก็บ plasmid DNA ที่สกัดได้ไปเก็บที่ - 20 องศาเซลเซียส ก่อนนำตรวจต่อไป

3.2.2.9 การตรวจตัวอย่าง Plasmid DNA

นำ Plasmid DNA ที่สกัดได้ปริมาณ 5 ไมโครลิตร/ 1 ปฏิกริยา PCR โดยใช้ PCR test kit (Invitrogen[®], USA) และ specific oligonucleotide primers (CUVET_Taura) โดย 1 ปฏิกริยา PCR ประกอบด้วย 10 X Buffer, 1 mM dNTP, 50mM MgCl₂, 0.1 mM forward primer, 0.1 mM reverse primer, plasmid DNA, Taq polymerase และ เติม sterile distilled water จนครบปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) แล้วนำเข้าเครื่อง Thermocycle (Perkin Elmer Cetus 9600, CA , USA) ตามโปรแกรมที่ได้ตั้ง อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบไว้ดังนี้ คือ ขั้นตอนในการ denaturation ใช้อุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที และขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส 1 นาที โดยมีจำนวนรอบทั้งหมด 40 รอบ หลังจากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน final extension ใช้อุณหภูมิที่ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วส่ง plasmid DNA ที่ได้ไปส่งหาลำดับเบสที่ บริษัท Pacific science, ประเทศไทย (Big Dye Terminator[®] Kit, Foster city, สหรัฐอเมริกา)

3.2.2.10 การตรวจสอบข้อมูลของลำดับเบสของเชื้อ Taura syndrome

นำข้อมูลของลำดับเบสที่ได้จากการส่ง sequence มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNA sequence analysis

3.3 การตรวจโรค White spot syndrome

3.3.1 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

(ทำวิธีเดียวกันกับการตรวจโรค Taura syndrome)

3.3.2 การศึกษาทางอณูชีววิทยา

3.3.2.1 การสกัด DNA จากตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ

ทำการสกัด DNA ในเนื้อเยื่อกุ้งตามวิธี Heat extraction (Wongtavatchai *et al.*, 2003) โดยนำตัวอย่างกุ้งบริเวณเหงือก ใส่ใน sterilized plastic bag ร่วมกับ sterilized ultrapure water ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร/ 0.1 – 0.5 กรัมของเนื้อเยื่อ แล้วบดด้วย tissue grinder หลังจากนั้นนำ suspension ที่ได้ ใส่ใน sterilized eppendorf ก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำ supernatant ที่ได้ ใส่ใน sterilized eppendorf ใหม่ แล้วนำ supernatant ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไป vortex ที่ความแรงสูงสุด ทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบ แล้วนำ supernatant ที่ได้ไปเก็บที่ – 20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ต่อไป

3.3.2.2 การสกัด DNA จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ

นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงจากบ่อกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำ filtrate และ ส่วนที่ติด filter membrane ไปสกัด DNA ตามวิธี Heat extraction (Wongtavatchai *et al.*, 2003) (อ้างอิงจากข้อ 3.3.2.1)

3.3.2.3 การสกัด DNA จากตัวอย่างสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ

นำสัตว์ที่สงสัยว่าเป็นพาหะจากบ่อกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค ได้แก่ หนอนแดง หอยเจดีย์ และจิ้งจิกน้ำ มาอย่างละ 3 - 5 ตัว/บ่อ นำไปสกัด DNA ตามวิธี Heat extraction (Wongtavatchai *et al.*, 2003) (อ้างอิงจากข้อ 3.3.2.1)

3.3.2.4 การตรวจตัวอย่าง DNA จากตัวอย่างกึ่งขาวและกึ่งกุลาดำ, น้ำเลี้ยง และสัตว์ที่อาจเป็นพาหะ

นำ DNA ที่สกัดได้ปริมาณ 13.5 ไมโครลิตร/ 1 ปฏิกริยา PCR โดยใช้ PCR test kit (Invitrogen[®], USA) และ specific oligonucleotide primers (commercial test Kit; Centext[®]) โดย 1 ปฏิกริยา PCR ประกอบด้วย 10 X Buffer, 1 mM dNTP, 50mM MgCl₂, 0.1mM forward primer, 0.1mM reverse primer, plasmid DNA, Taq polymerase และ เติมน้ำ sterile distilled water จนครบปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) แล้วนำเข้าเครื่อง Thermocycle (Perkin Elmer Cetus 9600, CA, USA) ตามโปรแกรมที่ได้ตั้งอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบไว้ดังนี้ คือ ขั้นตอนในการ pre-denaturation ใช้ อุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเริ่มขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 30 วินาที และขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยมีจำนวนรอบทั้งหมด 35 รอบ หลังจากนั้น เข้าสู่ขั้นตอน final extension ใช้อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจหาด้วยวิธี gel electrophoresis

3.3.2.5 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis

(อ้างอิงจากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ของโรค Taura syndrome ในข้อ

3.2.2.6) เห็นผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ commercial test kit (Centext[®]) ที่ 232 base pair

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

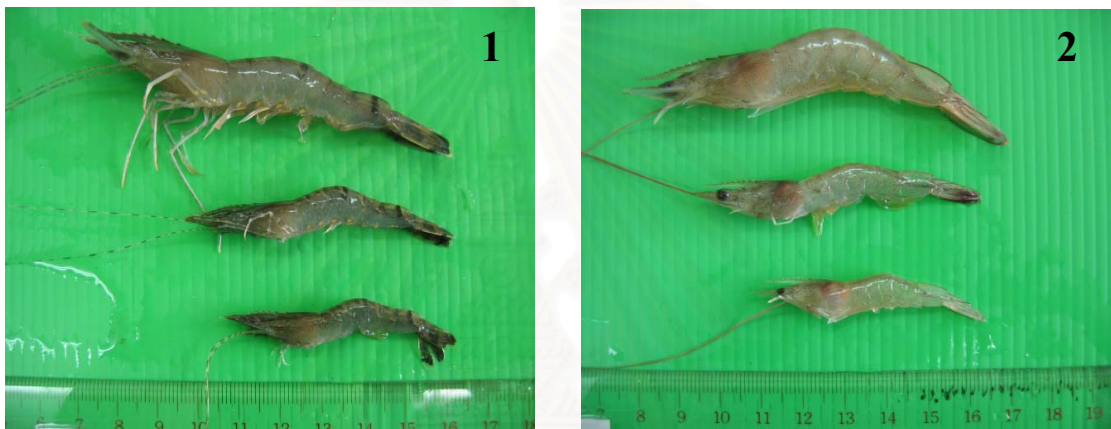
ผลการตรวจวินิจฉัยโรค Taura syndrome และ White spot syndrome ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาในกุ้งขาว และ กุ้งกุลาดำในระยะ Postlarvae และระยะเต็มวัย เป็นระยะเวลา 11 เดือน พบว่า ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome (TS) และ White spot syndrome (WSS) ในตัวอย่างกุ้งอย่างละ 12 บ่อ จากทั้งหมด 39 บ่อ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 สรุปการตรวจตัวอย่างกุ้งที่ทำการศึกษา

ชนิดกุ้ง	แหล่งตัวอย่าง	จำนวนบ่อ	ระยะกุ้ง	ผลการตรวจตัวอย่าง	
				TS	WSS
1. Lv	สมุทรสาคร	4	Adult	-	-
2. Lv	ฉะเชิงเทรา	6	Adult	+ (1/6)	-
3. Lv	ชุมพร	6	Adult	-	-
4. Lv	ตราด	1	Adult	-	-
5. Pm	ตราด	4	Adult	-	+ (2/4)
6. Lv	ฉะเชิงเทรา	3	Adult	+ (1/3)	-
7. Pm	ฉะเชิงเทรา	3	Adult	+ (3/3)	+ (1/3)
8. Lv	ฉะเชิงเทรา	5	Adult	+ (1/5)	+ (5/5)
9. Pm	ฉะเชิงเทรา	3	Adult	+ (3/3)	+ (3/3)
10. Pm	สมุทรสาคร	1	Postlarvae	+ (1/1)	-
11. Lv	ฉะเชิงเทรา	3	Adult	+ (2/3)	+(1/3)
รวมกุ้ง 2 ชนิด	4 จังหวัด	39 บ่อ		12 บ่อ	12 บ่อ

หมายเหตุ:	Pm	หมายถึง	<i>Penaeus monodon</i>
	Lv	หมายถึง	<i>Litopenaeus vannamei</i>
	+	หมายถึง	ผล positive
	-	หมายถึง	ผล negative

เมื่อทำการศึกษาจากตัวอย่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในฟาร์มเดียวกัน พบว่า กุ้งขาว และกุ้งกุลาดำในระยะ Postlarvae และระยะเต็มวัย ที่เพาะเลี้ยงในฟาร์ม สามารถติดเชื้อได้ทั้ง Taura syndrome และ White spot syndrome จากการตรวจตัวอย่างพบว่ากุ้งที่มีการติดเชื้อไวรัส มีลักษณะแคะแกระ็น แตกขนาด โดยวัดการแตกขนาดจากเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Coefficient of Variance, %CV) มีค่าเท่ากับ เปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน/ค่าเฉลี่ย (% standard deviation / average) (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะตัวอย่างกุ้งที่ทำการศึกษาวิจัย

- 1: การแตกขนาดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อเดียวกันกับกุ้งขาว ซึ่งตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome และ White spot syndrome
- 2: การแตกขนาดของกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่อเดียวกันกับกุ้งกุลาดำ ซึ่งตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome และ White spot syndrome

สถาบันนวัตกรรมการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ตารางเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของ
น้ำหนักกึ่งกับผลการตรวจวินิจฉัยโรคทางอณูชีววิทยา

ลำดับ	ตัวอย่าง ชุด / ID	กึ่ง		แหล่ง ตัวอย่าง	อัตราการปล่อยลูก กึ่ง X 10 ⁵ (ตัว/5 ไร่)	% CV	ผลการตรวจ ตัวอย่าง	
		ชนิด	อายุ (วัน)				TS	WSS
1.	D 17	Pm	20	ตราด	4	35.99	-	-
	18	Pm	20	ตราด	4	41.64	-	+
2.	E 23	Pm*	50	ฉะเชิงเทรา	7	34.26	+	-
	24	Pm*	50	ฉะเชิงเทรา	7	54.51	+	-
3.	E 25	Lv*	40	ฉะเชิงเทรา	9	39.08	-	-
	27	Lv*	40	ฉะเชิงเทรา	9	2.73	-	-
4.	F 28	Lv	40	ฉะเชิงเทรา	7.5	25.23	-	+
	29	Lv	40	ฉะเชิงเทรา	7.5	48.48	+	+
5.	F 30	Pm*	60	ฉะเชิงเทรา	7	34.71	+	+
	32	Pm*	60	ฉะเชิงเทรา	7	55.57	-	+
6.	F 33	Lv*	50	ฉะเชิงเทรา	9	46.04	-	+
	35	Lv*	50	ฉะเชิงเทรา	9	24.04	-	+
7.	H 37	Lv	48	ฉะเชิงเทรา	4.8	59.59	+	+
	38	Lv	48	ฉะเชิงเทรา	4.8	51.27	-	-

หมายเหตุ : Pm หมายถึง *Penaeus monodon*

Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*

+ หมายถึง ผล positive

- หมายถึง ผล negative

* หมายถึง ตัวอย่างที่เลี้ยงร่วมกันระหว่างกึ่งขาวและกึ่งกุลาดำในบ่อเดียวกัน

จากตารางที่ 4.2 พบว่ากลุ่มตัวอย่างกุ้งที่เป็นโรค ส่วนใหญ่มีการแตกขนาด โดยมี %CV สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างกุ้งที่ไม่เป็นโรค ที่อายุและอัตราการปล่อยลูกกุ้งที่เลี้ยงเท่ากัน สภาพแวดล้อม การเลี้ยงเหมือนกันและเลี้ยงในฟาร์มเดียวกัน (ลำดับที่ 1 และ 7) ถ้าภายในบ่อที่มีการติดเชื้อและ เลี้ยงรวมกันระหว่างกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ และมีผลรวมของอัตราการปล่อยลูกกุ้งที่หนาแน่นกว่า พบว่ามี %CV สูงกว่าบ่อที่มีผลรวมของอัตราการปล่อยลูกกุ้งที่หนาแน่นน้อยกว่า (ตารางที่ 4.2 ลำดับที่ 2, 3, 5 และ 6) นอกจากนี้การติดโรคทั้งสองโรคภายในบ่อเดียวกัน พบว่าทำให้กุ้งมีการ แตกขนาดเพิ่มมากกว่ากุ้งที่ติดโรคเพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 4.2 ลำดับที่ 4) และจากตารางที่ 4.3 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น กุ้งที่เป็นโรคจะมีการแตกขนาดมากขึ้น โดยดูจาก %CV ที่ เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.3 ลำดับที่ 2, 3, 5, 6 และ 7) นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยตรวจโรค ทั้งสองในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวตัวเดียวกัน พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในกุ้งป่วยตัว เดียวกัน ส่วนในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในน้ำเลี้ยง พบว่าการปนเปื้อน ของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ค ตารางที่ 1 - 2) และเมื่อตรวจซ้ำ น้ำเลี้ยงในบ่อเดิมหลังจากเลี้ยงกุ้งชุดใหม่ พบว่ายังคงตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในน้ำ (ภาคผนวก ค ตารางที่ 3 และ 5) และในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในสัตว์ที่อาจเป็น พาหะ ได้แก่ หนอนแดง หอยเจดีย์ และจิ้งจี้จากฟาร์มที่ตรวจพบโรค ผลปรากฏว่าไม่พบสาร พันธุกรรมของเชื้อไวรัสในสัตว์ทั้งสามชนิด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนและผลการตรวจโรคของ
ตัวอย่างกึ่งที่เลี้ยงบ่อเดียวกันและฟาร์มเดียวกันในจังหวัดฉะเชิงเทราด้วยวิธี PCR
ตรวจเมื่อวันที่ 1 และ 10 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547

ลำดับ	ตัวอย่าง ชุด / ID		1 มีนาคม 2547			10 มีนาคม 2547		
			% CV	TS	WSS	% CV	TS	WSS
1.	F 28		NA	NA	NA	25.23	-	+
2.	E 22	F 29	36.80	+	-	48.48	+	+
3.	E 23	F 30	34.26	+	-	34.71	+	+
4.	F 31		NA	NA	NA	16.94	-	+
5.	E 24	F 32	54.51	+	-	55.57	-	+
6.	E 25	F 33	39.08	-	-	46.04	-	+
7.	E 26	F 34	29.86	+	+	33.96	+	+
8.	E 27	F 35	2.73	-	-	24.04	-	+

หมายเหตุ : NA หมายถึง ไม่มีตัวอย่าง

+ หมายถึง ผล positive

- หมายถึง ผล negative

ตัวอย่างกึ่งชุดเดียวกันแต่ระยะเวลาเลี้ยงต่างกัน 10 วัน :

(E22 / F29), (E23 / F30), (E24 / F32), (E25 / F33), (E26 / F34), (E27 / F35)

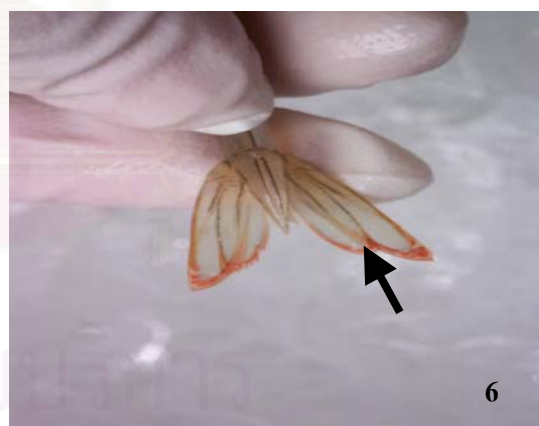
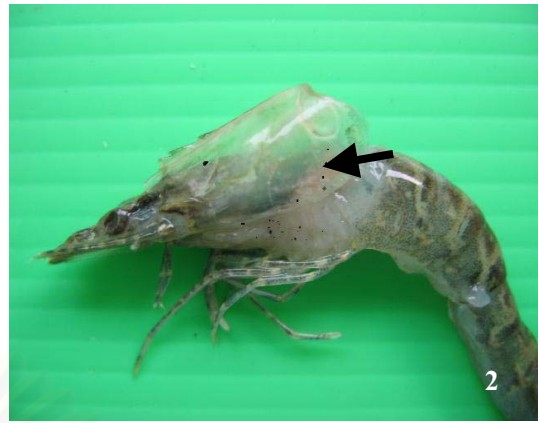
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

จากการตรวจตัวอย่างพบรอยโรคของกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ Taura syndrome มีจุดดำ (melanized) ที่เปลือก และแพนหางแดง (รูปที่ 4.2) การศึกษาทางจุลพยาธิสภาพ พบการตายของ haemopoietic cell ที่ lymphoid organ (รูปที่ 4.3) ซึ่งแสดงว่ากุ้งอยู่ในระยะ chronic phase โดยกุ้งอาจจะตาย หรือไม่ตายได้ แต่ยังคงเป็นพาหะแก่กุ้งบ่ออื่นภายในฟาร์มได้ นอกจากนี้ยังพบ intracytoplasmic inclusion bodies ซึ่งย้อมติดสี eosinophilic จนถึง darkly basophilic (รูปที่ 4.3) ส่วนกุ้งที่เป็นโรค White spot syndrome พบจุดขาวที่ได้เปลือกทั่วตัว (รูปที่ 4.4) และเมื่อศึกษาทางจุลพยาธิสภาพ พบ basophilic hypertrophied nuclei ที่เนื้อเยื่อเหงือกและแพนหาง ซึ่งย้อมติดสี basophilic (รูปที่ 4.5) นอกจากนี้ยังตรวจพบว่าในกุ้งป่วยตัวเดียวกันทั้งกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาว สามารถติดโรคได้ทั้งสองโรคภายในตัวเดียวกันได้ (รูปที่ 4.6 และ 4.9)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

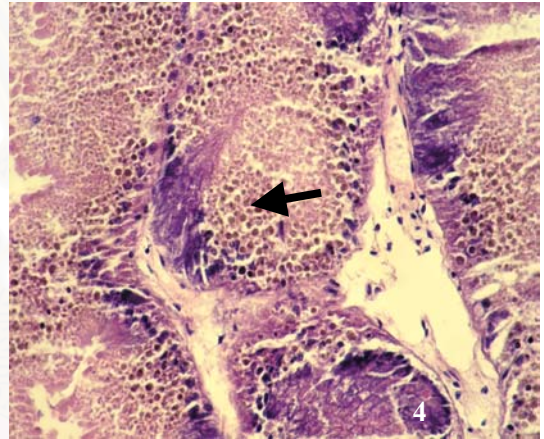
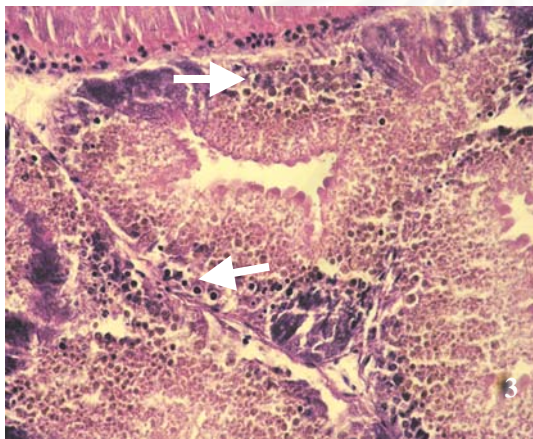
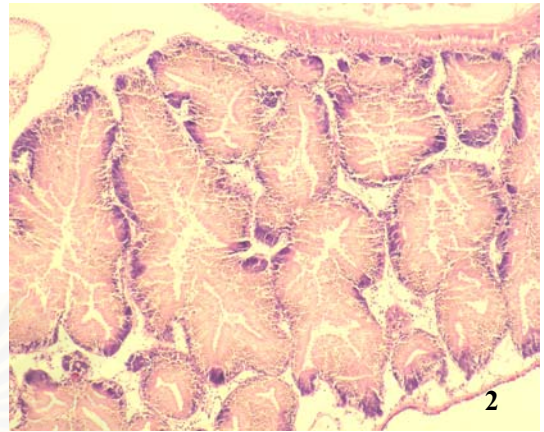
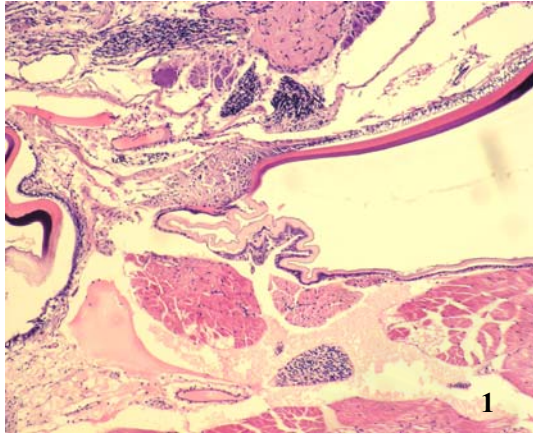


รูปที่ 4.2 แสดงรอยโรคบนตัวกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส Taura syndrome

1และ2 : พบรอยโรคจุดดำที่เปลือกในกุ้งกุลาดำ(ลูกศรชี้)และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome

3และ4 : พบรอยโรคจุดดำที่เปลือกกุ้งขาว(ลูกศรชี้)และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome

5และ6 : พบรอยโรคแพนหางแดงในกุ้งขาว(ลูกศรชี้)ที่ติดเชื้อ Taura syndrome และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome



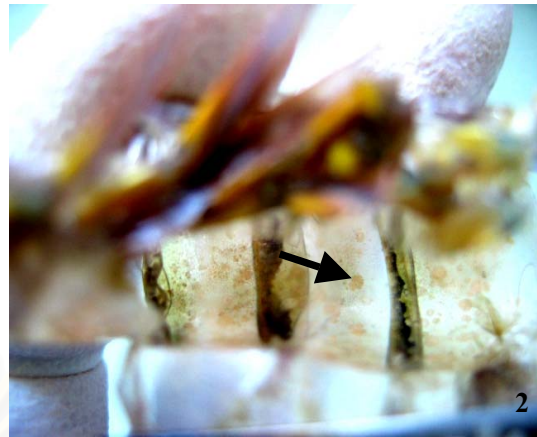
รูปที่ 4.3 แสดงจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัส Taura syndrome เมื่อย้อมด้วย hematoxylin – eosin stain

1 : เนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารของกึ่งที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (กำลังขยาย 40 เท่า)

2 : แสดงจุลพยาธิสภาพของ lymphoid organ ของกึ่งปกติ (กำลังขยาย 100 เท่า)

3 : พบลักษณะ intracytoplasmic inclusion bodies ที่ lymphoid organ ของกึ่งป่วย ซึ่งย้อมติดสี eosinophilic จนถึง darkly basophilic (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 400 เท่า)

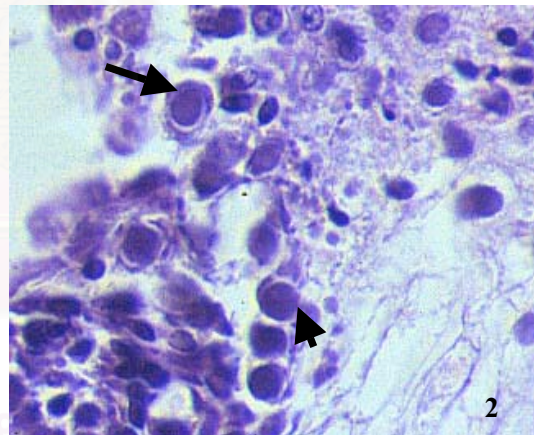
4 : พบการตายของ haemopoietic cell ที่ lymphoid organ ของกึ่งป่วย (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 400 เท่า)



รูปที่ 4.4 แสดงรอยโรคบนตัวกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส White spot syndrome

1 : จุดขาวที่ carapace ในกุ้งกุลาดำ (ลูกศรชี้) และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส White spot syndrome ในเนื้อเยื่อเหงือก

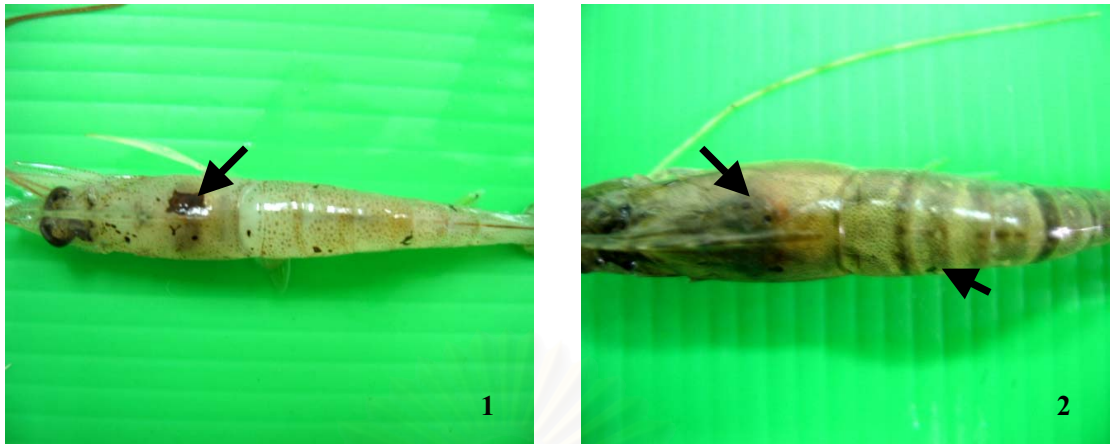
3 : จุดขาวที่เปลือกทั่วตัวในกุ้งกุลาดำ (ลูกศรชี้) และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส White spot syndrome ในเนื้อเยื่อเหงือก



รูปที่ 4.5 แสดงจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส White spot syndrome เมื่อย้อมด้วย hematoxylin – eosin stain

1 : แสดงลักษณะ basophilic hypertrophied nuclei ของ epithelial cell จากเนื้อเยื่อแพนหางในกุ้งที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส White spot syndrome (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 100 เท่า)

2 : แสดงลักษณะ basophilic hypertrophied nuclei ของ epithelial cell จากเนื้อเยื่อเหงือกในกุ้งที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส White spot syndrome (ลูกศรชี้) (กำลังขยาย 400 เท่า)



รูปที่ 4.6 แสดงรอยโรคบนตัวกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อทั้ง Taura syndrome และ

White spot syndrome

1: รอยโรคจุดดำที่เปลือกในกุ้งขาว (ลูกครี) และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส

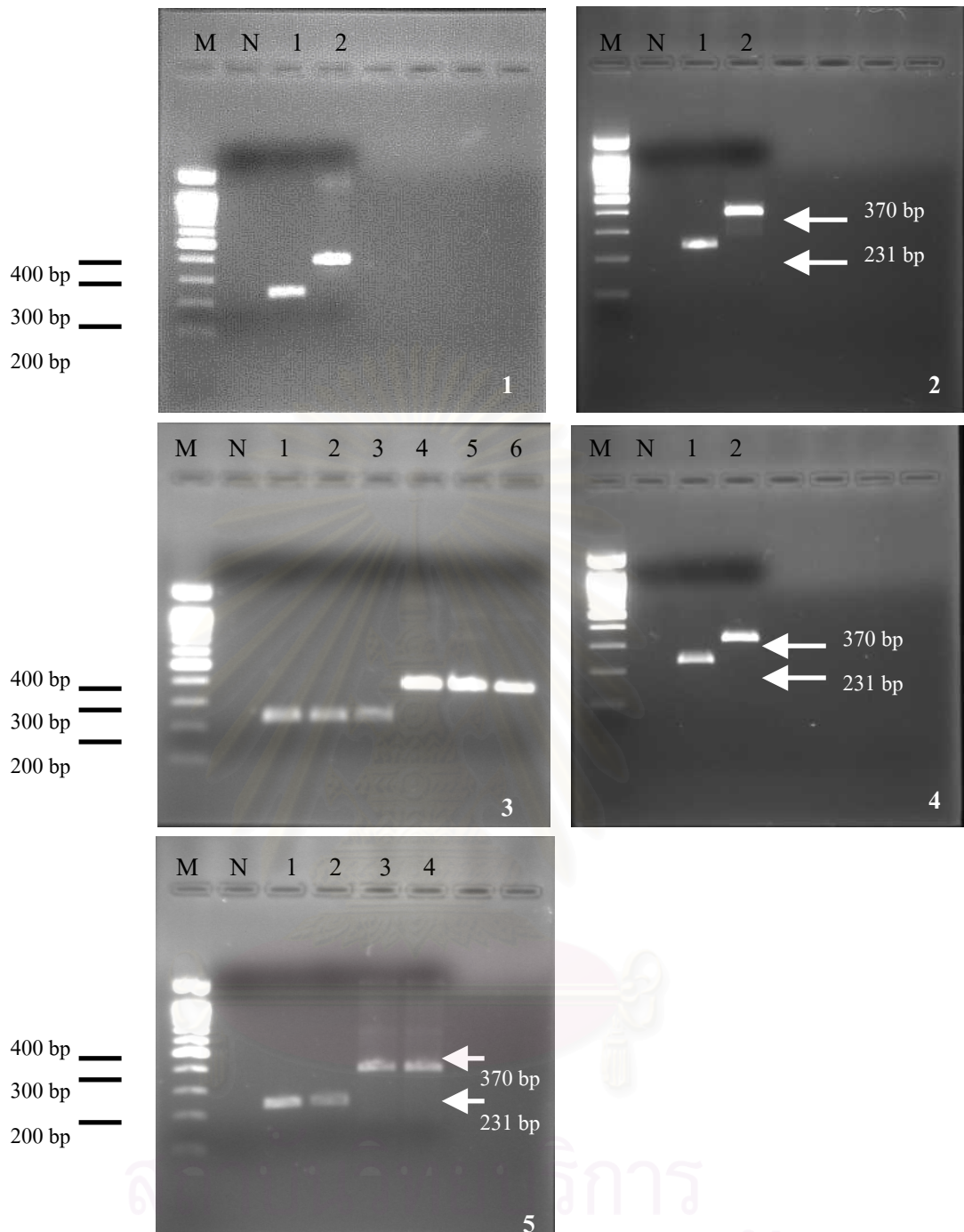
Taura syndrome และ White spot syndrome

2 : รอยโรคจุดดำที่เปลือกกุ้งกุลาดำ (ลูกครี) และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส

Taura syndrome และ White spot syndrome

4.2 การศึกษาทางอณูชีววิทยา (Molecular diagnosis)

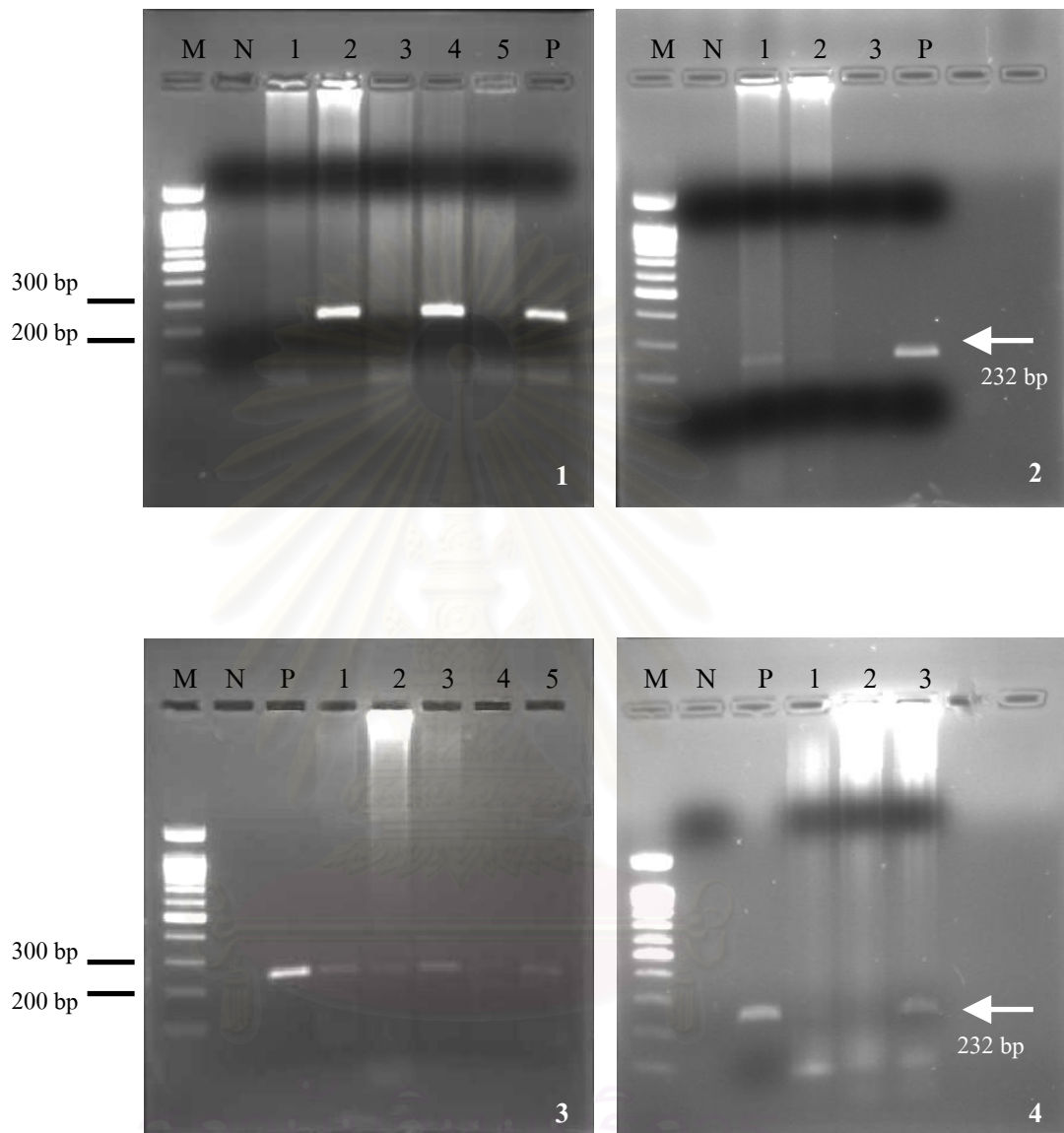
ในการตรวจวินิจฉัยโรค Taura syndrome จากตัวอย่างกุ้ง น้ำเลี้ยงและสัตว์ที่อาจเป็นพาหะทั้งสามชนิด ด้วยวิธี One - step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT – PCR) โดยใช้ OIE Marker (ประกอบด้วย Primer 9195 และ 9992) (OIE, 2003) และ CUVET_Taura Marker (ประกอบด้วย Primer TSV_F1 และ Primer TSV_R2) ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 231 bp และ 370 bp ตามลำดับ(รูปที่ 4.7, 4.9 และ 4.10) หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไปหาสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ CUVET_Taura Marker มาทำการ clone เข้าสู่ plasmid และ transform เข้าสู่ competent cell จากนั้นนำ plasmid DNA ที่ได้ไปตรวจด้วยวิธี PCR ก่อนส่งหาลำดับเบส ส่วนในการตรวจโรค White spot syndrome ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ใช้ commercial test kit (Centext[®]) แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ ไปวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel ที่ผสมด้วย ethidium bromide แล้ววิเคราะห์ผลด้วย UV illuminator ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 232 base pair (รูปที่ 4.8, 4.9 และ 4.11)



รูปที่ 4.7 แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี RT-PCR ในการตรวจโรค Taura syndrome

- 1: ตัวอย่างกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา 10 ตุลาคม 2546 [1: กุ้งขาว1 (OIE Marker); 2: กุ้งขาว1 (CUVET_Taura Marker)]
- 2: ตัวอย่างกุ้งจากจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 มีนาคม 2547 [1: กุ้งดำ6 (OIE Marker); 2: กุ้งดำ6 (CUVET_Taura Marker)]
- 3: ตัวอย่างกุ้งจากจังหวัดฉะเชิงเทรา 10 มีนาคม 2547 [1และ4: กุ้งขาว4 (OIE และ CUVET_Taura Marker); 2และ5: กุ้งดำ5 (OIE และ CUVET_Taura Marker); 3และ6: กุ้งดำ8 (OIE และ CUVET_Taura Marker)]
- 4: ตัวอย่างกุ้งจากจังหวัดสมุทรสาคร 10 พฤษภาคม 2547 [1: Postlarvae(OIE Marker); 2: Postlarvae(CUVET_Taura Marker)]
- 5: ตัวอย่างกุ้งจากจังหวัดฉะเชิงเทรา 13 กรกฎาคม 2547 [1และ3: กุ้งขาว5(OIE และ CUVET_Taura Marker); 2และ4: กุ้งขาว8 (CUVET_Taura Marker)]

Lane M: 100 bp Marker; N : H₂O control



รูปที่ 4.8 แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี PCR ในการตรวจโรค White spot syndrome จากตัวอย่างกุ้ง

1: ตัวอย่างกุ้งจังหวัดตราด 1 กุมภาพันธ์ 2547 (1: กุ้งดำ 1_20 วัน; 2: กุ้งดำ 2_20 วัน; 3: กุ้งดำ 3_30 วัน;
4: กุ้งดำ 5_100 วัน; 5: กุ้งขาว 6_30 วัน)

2: ตัวอย่างกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา 1 มีนาคม 2547 (1: กุ้งดำ 8_50 วัน; 2: กุ้งขาว 8_40 วัน; 3: กุ้งดำ 5_50 วัน)

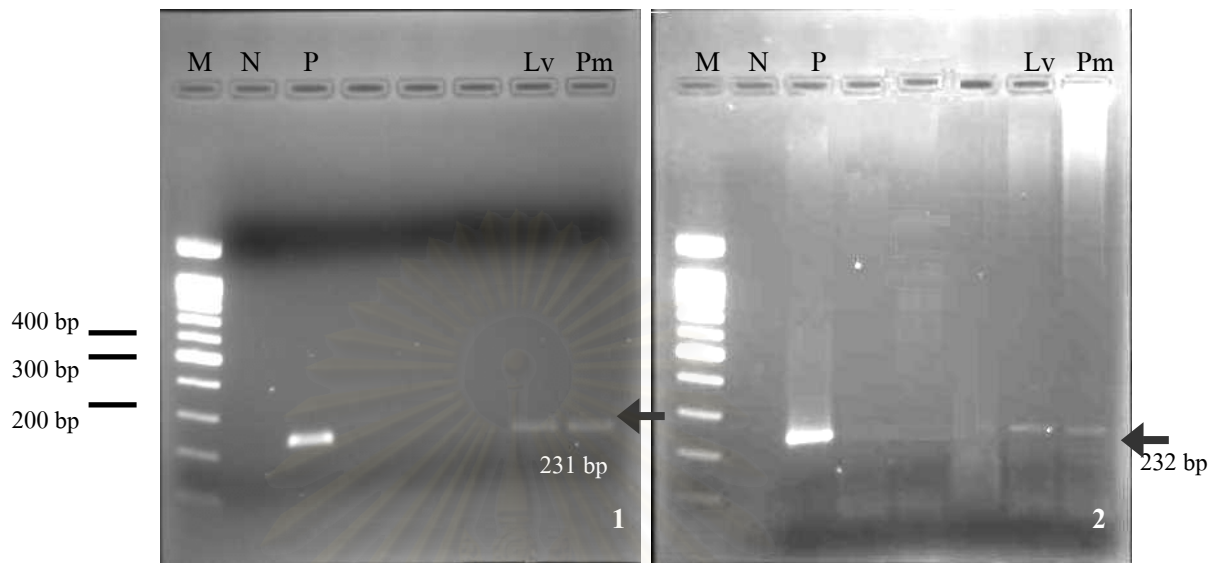
3: ตัวอย่างกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา 10 มีนาคม 2547 (1: กุ้งขาว 3_40 วัน; 2: กุ้งขาว 4_40 วัน;

3: กุ้งดำ 5_60 วัน; 4: กุ้งขาว 5_50 วัน; 5: กุ้งดำ 6_60 วัน)

4: ตัวอย่างกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา 13 กรกฎาคม 2547 (1: กุ้งขาว 8_28 วัน; 2: กุ้งขาว 6_48 วัน;

3: กุ้งขาว 5_48 วัน)

Lane M: 100 bp Marker; N: H₂O control; P: Positive control



รูปที่ 4.9 แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี RT-PCR ในการตรวจโรค Taura syndrome และ

แถบ DNA จากวิธี PCR ในการตรวจโรค White spot syndrome

1: ตัวอย่างกุ้งจากจังหวัดฉะเชิงเทรา 10 มีนาคม 2547 (Lv: กุ้งขาว; Pm: กุ้งกุลาดำ)

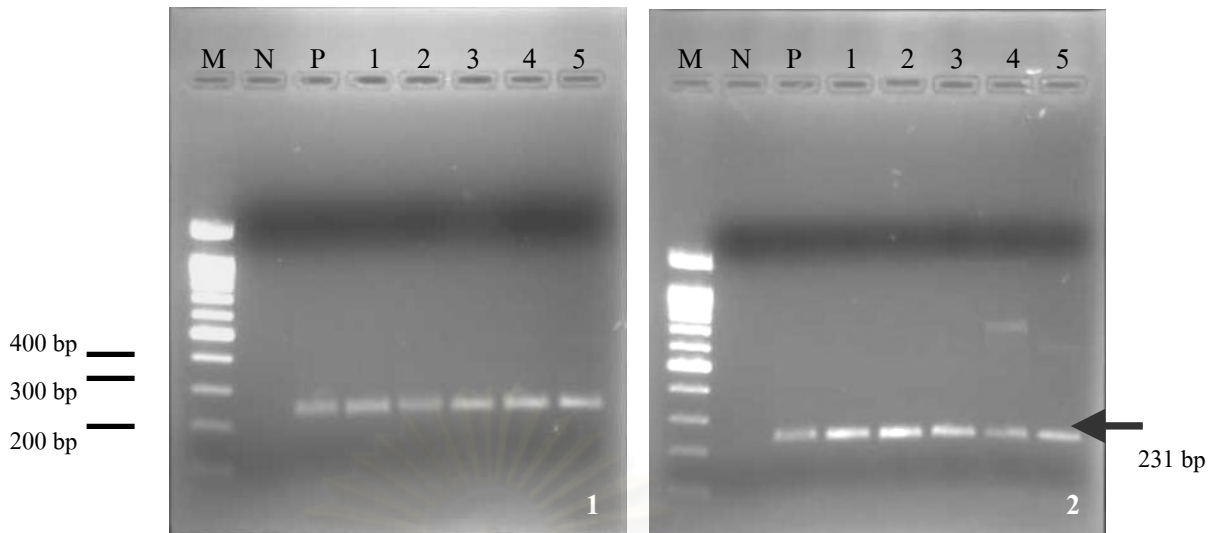
(OIE Marker)

2: ตัวอย่างกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา 10 มีนาคม 2547 (Lv: กุ้งขาว; Pm: กุ้งกุลาดำ)

(CENTEXT[®])

Lane M: 100 bp Marker; N : H₂O control; P: Positive control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

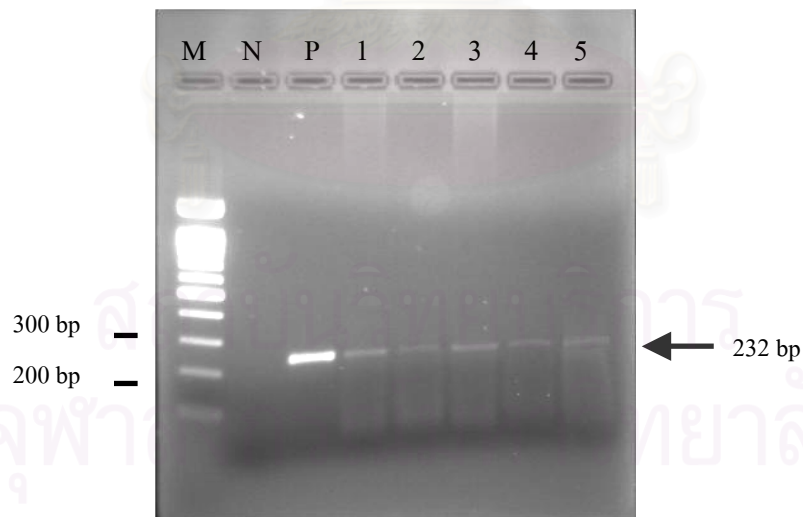


รูปที่ 4.10 แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี RT-PCR ในการตรวจโรค Taura syndrome
ในน้ำเลี้ยง

1: น้ำเลี้ยงกึ่งส่วนfiltrate จังหวัดฉะเชิงเทรา 10 มีนาคม 2547 [1: บ่อ3; 2: บ่อ4; 3: บ่อ5 ;
4: บ่อ6; 5: บ่อ8 (OIE MARKER)]

2: น้ำเลี้ยงกึ่งส่วนที่ติด filter membrane จังหวัดฉะเชิงเทรา 10 มีนาคม 2547 [1: บ่อ3;
2: บ่อ4; 3: บ่อ5; 4: บ่อ6; 5: บ่อ8 (OIE MARKER)]

Lane M: 100 bp Marker; N : H₂O control; P: Positive control



รูปที่ 4.11 แสดงการวิเคราะห์แถบ DNA จากวิธี PCR ในการตรวจโรค White spot syndrome
ในน้ำเลี้ยง

1: ตัวอย่างกึ่งจังหวัดฉะเชิงเทรา 10 มีนาคม 2547(1: บ่อ3; 2: บ่อ4; 3: บ่อ5 ; 4: บ่อ6;
5: บ่อ8)

Lane M: 100 bp Marker; N : H₂O control; P: Positive control

4.2.1 ข้อมูลลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ Taura syndrome virus

นำตัวอย่างที่ทำการ clone DNA และสกัด Plasmid ส่งไปหาลำดับเบส (ตารางที่ 4.4 – 4.15)

ตารางที่ 4.4 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 (ให้ชื่อว่า CLO_OCTcu)(ภาคผนวก ข รูปที่ 1)

CLO_OTCcu (355bp)	CGCGATGTGCCAGGCCGATTGTCATTTCCGTTCTCATCCACTTATTT CAGCTTCGACAGTCTCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGTGCAT TGGAGCAATTTGGAGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCTAAAGCAG CCATCGGCTTCAATTATCCAGCAGATGTTCCCTGAGGAGCCCCTTTT TCAGTAACGCGTGCTCCAGTATCAGGAACACTGTTTACGTTACTCCA GGATACGAAGGTGTCTTTGGGGGAAGCTGACGGTGTATTCTCATTG TACTTTACGAACACTACCACTGGTAGAAGGCACAGACCAGCTTATGC CGGACTGCCTGGGGGAACATCGGTAAAA
----------------------	---

ตารางที่ 4.5 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2547 (ให้ชื่อว่า B4MAR01T) (ภาคผนวก ข รูปที่ 2)

B4MAR01T (354 bp)	AGCACTCTCGTGACCGCGTAGGCAATTGCTATCTGATCCGCTTATC TCAGCTTCGAACAGTATCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGTGC ATTGGAGCAATTTGGAGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCTAAAGC AGCCATCGGCTTCAATTATCCAGCAGATGTTCCCTGAGGAGCCCAC TTTTTCAGTAACGCGTGCTCCAGTATCAGGAACACTGTTTACGTTA CTCCAGGATACGAAAGTGTCTTTGGGGGAAGCTGACGGTGTATTC TCATTGCACTTTACGAACACTACCACTGGTAAAAGGCACAGACCA GCTTATGCCGGACTGCCTGGTGGAACTCGGTAGG
----------------------	---

ตารางที่ 4.6 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ่มกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือน มีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า BS5_TSV) (ภาคผนวก ข รูปที่ 3)

BS5_TSV	GGCCGAATGTCATTTCCGTTCTCATCCACTTATCTCAGCTTCGACAG
(326 bp)	TCTCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGTGCATTGGAGCAATTTGG AGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCTAAAGCAGCCATCGGCTTCAA TTATCCAGCAGATGTTCCCTGAGGAGCCCACTTTTTTCAGTAACGCGTG CTCCAGTATCAGGAACACTGTTTACGTTACTCCAGGATACGAAAGTG TCTTTGGGGGAAGCTGACGGTGTATTCTCATTGCACTTTACGAACAC TACCACTGGTAAAAGGCACAGACCAGCTTATGCCGGACTGCCTG

ตารางที่ 4.7 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ่มกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือน มีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B6MAR01_TSV) (ภาคผนวก ข รูปที่ 4)

B6MAR01_TSV	CGAGATGTGCCAGGCCGATTGTCATTTCCGTTCTCATCCACTTA
(338 bp)	TCTCAGCTTCGACAGTCTCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGT GCATTGGAGCAATTTGGAGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCTA AAGCAGCCATCGGCTTCAATTATCCAGCAGATGTTCCCTGAGGAG CCCACTTTTTCAGTAACGCGTGCTCCAGTATCAGGAACACTGTTT ACGTTACTCCAGGATACGAAAGTGTCTTTGGGGGAAGCTGACGG TGTATTCTCATTGCACTTTACGAACACTACCACTGGTAAAAGGCA CAGACCAGCTTATGCCGGACTGCCG

ตารางที่ 4.8 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือน มีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B8MAR01_TSV) (ภาคผนวก จ รูปที่ 5)

B8MAR01_TSV (355 bp) CGAGATGTGCCAGGCCGATTGTCATTTCCGTTCTCATCCACTTAT
CTCAGCTTCGACAGTCTCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGT
GCATTGGAGCAATTTGGAGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCTA
AAGCAGCCATCGGCTTCAATTATCCAGCAGATGTTCTGAGGAG
CCCACCTTTTCAGTAACGCGTGCTCCAGTATCAGGAACACTGTTT
ACGTTACTCCAGGATACGAAAGTGTCTTTGGGGGAAGCTGACGG
TGTATTCTCATTGCACTTTACGAACACTACCACTGGTAAAAGGCAC
AGACCAGCTTATGCCGGACTGCCGGTAAGAACTCGGTAAAA

ตารางที่ 4.9 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10 เดือน มีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS4_TSV) (ภาคผนวก จ รูปที่ 6)

WS4_TSV (325 bp) GGCCGATTGTCATTTCCGTTCTCATCCACTTATCTCAGCTTCGACAG
TCTCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGTGCATTGGAGCAATTTGG
AGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCTAAAGCAGCCATCGGCTTCAA
TTATCCAGCAGATGTTCTGAGGAGCCACTTTTTTCAGTAACGCGTG
CTCCAGTATCAGGAACACTGTTTACGTTACTCCAGGATACGAAAGTG
TCTTTGGGGGAAGCTGACGGTGTATTCTCATTGCACTTTACGAACAC
TACCACTGGTAAAAGGCACAGACCAGCTTATGCCGGACTGCCT

ตารางที่ 4.10 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ่มกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10
เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B5MAR10_TSV) (ภาคผนวก ข รูปที่ 7)

B5MAR10_TSV CGCAATGTGCCAGGCCGATTGCATTTCCGTTCTCAATCCACTTAT
(346 bp) CTCAGCTTCGACAGTCTCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGTG
CATTGGAGCAATTTGGAGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCTAAA
GCAGCCATCGGCTTCAATTATCCAGCAGATGTTCTGAGGAGCCC
ACTTTTTTCAGTAACGCGTGCTCCAGTATCAGGAACACTGTTTACGT
TACTCCAGGATACGAAAGTGTCTTTGGGGGAAGCTGACGGTGTAT
TCTCATTGCACTTTACGAACACTACCACTGGTAAAAGGCACAGACC
AGCTTATGCCGGACTGCCTGTAGAACT

ตารางที่ 4.11 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ่มกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10
เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า BS8_TSV) (ภาคผนวก ข รูปที่ 8)

BS8_TSV GCCGATTGTCTTTCCGTTCTCATCCACTTATCTCAGCTTCGACAGTCTC
(323 bp) TCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGTGCATTGGAGCAATTTGGAGTT
GCTGAACCAGGTACGCTTGCTAAAGCAGCCATCGGCTTCAATTATCCA
GCAGATGTTCTGAGGAGCCACTTTTTTCAGTAACGCGTGCTCCAGTA
TCAGGAACACTGTTTACGTTACTCCAGGATACGAAAGTGTCTTTGGGG
GAAGCTGACGGTGTATTCTCATTGCACTTTACGAACACTACCACTGGT
AAAAGGCACAGACCAGCTTATGCCGGACTGCCT

ตารางที่ 4.12 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ่มกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10
เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B8MAR10_TSV) (ภาคผนวก ข รูปที่ 9)

B8MAR10_TSV TGTGCCAGGCCGATTGTCTTTCCGTTCTCATCCACTTATCTCAGCT
(343 bp) TCGACAGTCTCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGTGCATTGG
AGCAATTTGGAGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCTAAAGCAGC
CATCGGCTTCAATTATCCAGCAGATGTTCCCTGAGGAGCCCACCTT
TTCAGTAACGCGTGCTCCAGTATCAGGAACACTGTTTACGTTACT
CCAGGATACGAAAGTGTCTTTGGGGGAAGCTGACGGTGTATTCT
CATTGCACTTTACGAACACTACCACTGGTAAAAGGCACAGACCA
GCTTATGCCGGACTGCCTGTAGAAACTCGG

ตารางที่ 4.13 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ่มกุลาดำ จังหวัดสมุทรสาคร ณ วันที่ 15
เดือนพฤษภาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า PST_TSV) (ภาคผนวก ข รูปที่ 10)

PST_TSV ACCAGCATGCATCCACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCCGACC
(360 bp) TGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTGTATTACCGAGTTCACCAGGC
AGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTACACACGTCATACAATGG
CCGGTACAGAGGGCTGCCAACCCGCGAGGGGGAACCAATCCCAG
AAAACCGGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCCTGA
AGTCGGAATCTCTAATAATCGCGGATCAACTTGCCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGTCTTGTACAGACCGCCCGTCTCACCATGGGAGCGGG
TTCTGCCGCAGGTAGTTAACCTAACCGCAGGGATGGCCATTAC

ตารางที่ 4.14 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 13
เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS5JUL13_TSV) (ภาคผนวก ฉ รูปที่ 11)

WS5JUL13_TSV (343 bp) GGAATTCTGCCGAGTCGGATACATTACATATCAGAATCCCTTGT
CTCAGCTTCGACAGTATCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGGT
GCATTGGAGCAATTTGGAGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGCT
AAAGCAGCCATCGGCTTCAATTATCCAGCAGATGTTCTGAGG
AGCCCACTTTTTTCAGTAACGCGTGCTCCAGTATCAGGAACACT
GTTTACGTTACTCCAGGATACGAAGGTGTCCTTGGGGGAAGCC
GACGGTGTATTCTCATTGTACTTTACGAACACTACCACTGGTAG
AAGGCACAGACCAGCTTATGCCGGACTGCCTGGTGAACCTCGG
TAAG

ตารางที่ 4.15 แสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 13
เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS8JUL13_TSV) (ภาคผนวก ฉ รูปที่ 12)

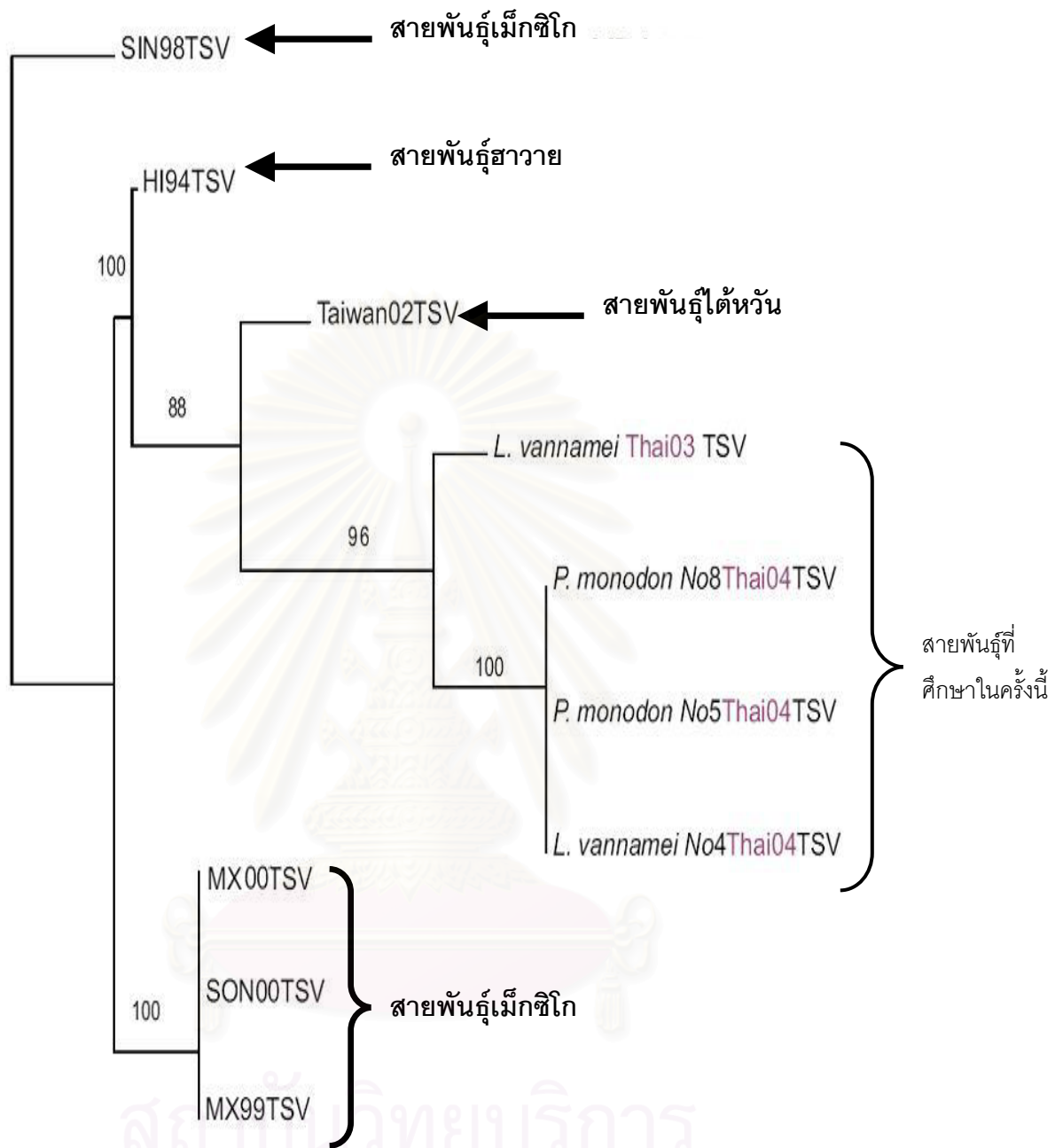
WS8JUL13_TSV (357 bp) AGCATTCTCGAAGCCGGATATCATTATCGAATCTGAAACCCTTA
TCTCAGCTTCGACAGTCTCTCCTAATATTGTCATGTATCCTTGGG
TGCATTGGAGCAATTTGGAGGTTGCTGAACCAGGTACGCTTGC
TAAAGCAGCCATCGGCTTCAATTATCCAGCAGATGTTCTGAGG
AGCCCACTTTTTTCAGTAACGCGTGCTCCAGTATCAGGAACACTG
TTTACGTTACTCCAGGATACGAAGGTGTCCTTGGGGGAAGCCG
ACGGTGTATTCTCATTGTACTTTACGAACACTACCACTGGTAGAA
GGCACAGACCAGCTTATGCCGGACTGCCTGTTGGAACCTCGGTA
ATAAAG

4.2.2 การศึกษา Phylogenetic relationship

จากผลการศึกษา phylogenetic relationship ในส่วนของ VP1 ของเชื้อไวรัส Taura syndrome virus จากตัวอย่างที่เก็บได้ระหว่างทำการศึกษา กับลำดับเบสของไวรัสชนิดนี้ สายพันธุ์อื่นในข้อมูล Genebank ซึ่งประกอบด้วย สายพันธุ์ HI94TSV (accession number AF510518.1/ gi:25992171), SIN98TSV (accession number AF510515.1/ gi:25992165), MX99TSV (accession number AF510516.1/ gi:25992167), SON2KTSV (accession number AF510517.1/ gi:25992169), Taiwan (accession number AF406789.1/ gi:21666574) และ Mexican (accession number AF277378.1/ gi:12006327) โดยการใช้โปรแกรม Genetyx พบว่า ลำดับเบสของไวรัสตัวอย่างที่ทำการศึกษาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ไวรัสของประเทศไต้หวัน โดยพบว่ามี ความเหมือนมากกว่าสายพันธุ์จากอเมริกาและเม็กซิโกตามลำดับ (รูปที่ 4.12)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 แสดง Phylogenetic tree (Neighbor joining tree) และ Bootstrap number ที่กิ่งของ ต้นไม้ แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส Taura syndrome ในตัวอย่างกุ้งที่ทำการศึกษา ครั้งนี้กับสายพันธุ์อื่นๆ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของส่วน VP1 ของเชื้อไวรัส Taura syndrome TS ที่มีขนาด 327 bp

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยง สามารถติดโรคได้ทั้ง Taura syndrome และ White spot syndrome และในกุ้งป่วยตัวเดียวกัน สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดได้ การที่กุ้งมีการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในบ่อเดียวกัน น่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งของการแตกขนาดของกุ้งที่เลี้ยงในบ่อนั้น นอกจากนี้ยังตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดปนเปื้อนในน้ำเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยเมื่อเลี้ยงกุ้งชุดใหม่ ยังคงตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในน้ำที่เพาะเลี้ยงได้ และวิธีที่ใช้ในการศึกษาทางอณูชีววิทยาครั้งนี้ ยังสามารถใช้ตรวจเชื้อไวรัส Taura syndrome ได้ในกุ้งระยะ Postlarvae

ในการศึกษาหาสายพันธุ์ของ Taura syndrome virus จากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ CUVET_Taura Primer พบว่าเชื้อไวรัสที่ระบาดอยู่ในฟาร์มเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ไวรัสของประเทศไต้หวันมากกว่าสายพันธุ์จากอเมริกาและเม็กซิโก แสดงให้เห็นว่าการเกิดโรค Taura syndrome ในกุ้งทะเลที่เลี้ยงในประเทศ มาจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ของประเทศไต้หวัน

ส่วนในการศึกษาจุลพยาธิสภาพของกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค พบว่ากุ้งทั้งสองชนิดที่เป็นโรค Taura syndrome มีลักษณะ intracytoplasmic inclusion bodies ที่ lymphoid organ และพบการตายของ haemocyte ส่วนกุ้งที่เป็นโรค White spot syndrome พบลักษณะ basophilic hypertrophied nuclei ที่เนื้อเยื่อเหงือกและแพนหาง

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการตรวจวินิจฉัยโรคทั้งสองด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและจำเพาะสูง ใช้เวลาไม่นานเมื่อเทียบกับวิธีอื่น และอาจจะประเมินการติดเชื้ออย่างคร่าวๆว่ามีการติดเชื้อมากหรือน้อยโดยสังเกตจากความบางหรือหนาของแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis จากรายงานของ Magbanua และคณะ (2000) พบว่าในการตรวจการติดเชื้อของ White spot syndrome ด้วยวิธี PCR และ antibody (Ab) – based Western blot assay นั้น วิธี PCR มีความไวมากกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี antibody (Ab) – based Western blot assay นอกจากนี้ การตรวจด้วยวิธีทางอณูชีววิทยายังสามารถตรวจการเกิด co-infection ของโรคในกุ้งได้ในระยะเวลาอันสั้น ทำให้ลดโอกาสของการสูญเสียที่อาจเกิดขึ้นได้

จากการทดลองของ Tsai และคณะ(2002) ที่ตรวจสอบโรค Taura syndrome และ White spot syndrome ด้วยวิธี Multiplex reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) ในกุ้งขาว ใช้ primer ทั้งหมด 3 ชุด ประกอบด้วย Primer 9195F/9992R (Taura syndrome), 94F2/R2 (White spot syndrome) และ ITS F/28S R (internal control) สามารถตรวจกึ่งที่มีการเกิด co-infection ระหว่างโรค Taura syndrome และ White spot syndrome ได้ในเวลาเดียวกัน

การตรวจวินิจฉัยทางอณูชีววิทยา ยังสามารถนำมาใช้ตรวจพ่อแม่พันธุ์ที่จะนำเข้ามาปลอดจากโรคหรือไม่ เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาไม่นาน และไม่ทำให้สัตว์ตาย และยังนำมาใช้ตรวจลูกกุ้งก่อนปล่อยลงสู่บ่อดิน รวมถึงน้ำที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ทำให้ลดโอกาสการเกิดโรครวมถึงความสูญเสียที่จะเกิดขึ้นได้ แต่วิธีการตรวจนี้มีข้อเสีย คือ ในการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนส่งตรวจ ถ้าทำการเก็บรักษาตัวอย่างไม่ดีพอ โดยเฉพาะในการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจโรค Taura syndrome ซึ่งเป็น RNA virus อาจทำให้ตรวจไม่พบเชื้อและอ่านผลผิดพลาดได้ ฉะนั้นในการเลือกวิธีการตรวจต้องสัมพันธ์กับวิธีในการเก็บรักษาตัวอย่าง และขนาดหรืออายุของกุ้งว่าเหมาะกับวิธีใด เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องมากที่สุด

จากการตรวจวินิจฉัยโรค Taura syndrome และ White spot syndrome ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถนำมาใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในน้ำ โดยใช้วิธีการสกัดสารพันธุกรรมวิธีเดียวกับเนื้อเยื่อกุ้ง สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในน้ำ ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ใช้ส่วน filtrate และส่วนที่ติดอยู่บน filter membrane มาตรวจสอบหาสารพันธุกรรม และเมื่อทำการวิเคราะห์แถบ DNA บน 2% agarose gel electrophoresis พบว่าสารพันธุกรรมที่ได้จากส่วน filtrate จะให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์มากกว่าส่วนที่ติดบน filter membrane โดยพบว่าสารพันธุกรรมที่ติดบน filter membrane ให้ non-specific band มากกว่า ซึ่งวิธีในการตรวจตัวอย่างน้ำจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ สามารถที่จะนำไปใช้ตรวจเป็นประจำในฟาร์มได้

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่ากลุ่มตัวอย่างกุ้งที่เป็นโรค และตรวจพบเชื้อไวรัสจะมีการแตกขนาดโดยมี %CV สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ไม่เป็นโรค ที่อายุและอัตราการปล่อยลูกกุ้งที่เลี้ยงเท่ากัน สภาพแวดล้อมการเลี้ยงเหมือนกัน และเลี้ยงในฟาร์มเดียวกัน แต่ถ้าภายในบ่อที่มีการติดเชื้อเหมือนกัน แต่มีผลรวมของอัตราการปล่อยลูกกุ้งที่หนาแน่นกว่า จะพบว่ามี%CVสูงกว่าบ่อที่มีอัตราการปล่อยลูกกุ้งที่น้อยกว่า เนื่องมาจากว่าอัตราการปล่อยลูกกุ้งมีผลทำให้กุ้งเครียดและติดโรคได้ง่ายขึ้น (Jory, 1999) นอกจากนี้พบว่ากุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส Taura syndrome และ White spot syndrome มี %CV ที่เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น เนื่องจากกุ้งที่ติดเชื้อแต่รอดตาย มีการเจริญเติบโตที่ช้า ส่วนกุ้งบางส่วนที่ไม่ติดเชื้อ สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ทำให้

ขนาดและน้ำหนักตัวของกุ้งในบ่อ แตกต่างกันอย่างชัดเจน และเมื่อเลี้ยงต่อไป พบว่ากุ้งที่เลี้ยงจะติดเชื้อมากขึ้น เนื่องมาจากกุ้งที่ติดเชื้อและรอดตายนั้น เป็นพาหะที่สำคัญของโรคทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคภายในบ่อได้ รวมถึงการกินซากกุ้งที่ติดเชื้อ ทำให้ติดโรคได้ โดยซากกุ้งที่ติดเชื้อเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้มีการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในน้ำที่เพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งถ้าฟาร์มที่เพาะเลี้ยงไม่มีการบำบัดน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงก่อนนำกลับมาใช้หมุนเวียนภายในฟาร์ม รวมถึงการบำบัดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคภายในฟาร์ม และบริเวณใกล้เคียงได้ นอกจากนี้การแพร่กระจายของโรคไปกับน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ อาจมาจากพาหะที่เป็นตัวนำเชื้อไวรัสได้

จากรายงานของ Supamattaya และคณะ (1997) พบว่าปูม้า (*Portunus pelagicus*) ปูทะเล (*Scylla serrata*) และเคย (*Acetes* sp.) ที่กินอาหารที่มีเชื้อไวรัส White spot syndrome ผสมอยู่ สามารถเป็นพาหะของโรคได้โดยตัวมันเองไม่แสดงอาการของการติดเชื้อ นอกจากนี้อาจมาจากหอยที่อยู่ในบ่อเลี้ยงกุ้ง หรือแมลง (Kasonchandra *et al.*, 1998; Gabriel and Felipe, 2000) หรือในกรณีของ Taura syndrome จะมาจากมูลของนกที่กินกุ้งที่ติดเชื้อ (Garza *et al.*, 1997) ซึ่งล้วนเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคได้

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome และ White spot syndrome ในสัตว์ที่อาจเป็นพาหะภายในฟาร์ม ได้แก่ จิ้งจิ้งจี้ หอยเจดีย์ และไส้เดือน ผลการตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในสัตว์ทั้งสามชนิด แต่ตรวจพบการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงทุกบ่อ โดยพบว่าผลการตรวจคุณภาพน้ำในบ่อไม่สามารถแสดงตัวชี้วัดของคุณภาพน้ำที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (ภาคผนวก ง ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังตรวจพบการปนเปื้อนในน้ำที่ใช้เลี้ยงในกุ้งชุดใหม่ เนื่องจากภายในฟาร์มที่ทำการศึกษา (ภาคผนวก จ รูปที่ 1) มีการบำบัดน้ำที่ไม่ดีพอ โดยนำน้ำที่ใช้หลังจากจับกุ้งขายเข้าบ่อพัก แล้วปล่อยให้ปลากินซากกุ้ง และเมื่อเลี้ยงกุ้งชุดใหม่ จะนำน้ำจากบ่อพักเข้าในบ่อเลี้ยง จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำที่ปนเปื้อนสารพันธุกรรมไวรัสยังคงอยู่ภายในฟาร์ม และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคภายในฟาร์ม และอาจทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคในบริเวณใกล้เคียงได้ถ้ามีการปล่อยน้ำที่ปนเปื้อนสารพันธุกรรมออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ฉะนั้นถ้าตรวจพบการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในน้ำ ควรพักน้ำและบำบัดน้ำก่อนที่จะนำมาใช้ หรือก่อนปล่อยออกสู่แหล่งน้ำต่อไป โดยวิธีการบำบัดอาจใช้สารเคมีในการบำบัด ได้แก่ การใช้แคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 20 ppm ในการบำบัดน้ำที่ปนเปื้อน (Chanratchakool and Phillips, 2002) ร่วมกับการบำบัดโรคในลูกกุ้งที่ติดเชื้อ เพื่อลดการแพร่กระจายของโรค จากรายงานการวิจัยของพรเลิศ และคณะ (2540) พบว่าการใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 100 – 150 ppm

แช่ลูกกุ้งที่ติดเชื้อนาน 30 – 60 นาที ก่อนทำการคัดแยกลูกกุ้งอ่อนแ่ที่ติดเชื้อบางส่วนออกไป ช่วยลดปริมาณลูกกุ้งที่ติดเชื้อ White spot syndrome ได้

ในการนำกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำมาเลี้ยงรวมกันภายในบ่อเดียวกันนั้น เป็นการทำให้โรค Taura syndrome ที่คาดว่ามาจากกุ้งขาว และยังไม่พบมีรายงานการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงประเทศไทย และ White spot syndrome ที่คาดว่ามาจากกุ้งกุลาดำ มีการข้ามสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสจากกุ้งสายพันธุ์หนึ่งมายังอีกสายพันธุ์หนึ่ง แล้วทำให้เกิดความเสียหายได้ จากการศึกษาพบว่ากุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงรวมในบ่อเดียวกัน ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ทั้ง Taura syndrome และ White spot syndrome ในกุ้งทั้งสองชนิด และพบว่าภายในกุ้งตัวเดียวกันสามารถติดเชื้อได้ทั้งสองโรค และเมื่อเลี้ยงต่อไป พบว่าทั้งกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวตายหมดทั้งบ่อ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเกิดโรคร่วมกัน ทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น ควรจึงมีการศึกษากลไกในการเกิดโรคร่วมกันต่อไป

จากการศึกษาพบว่ากุ้งกุลาดำที่เป็นโรค Taura syndrome มีอาการและรอยโรคเช่นเดียวกับกุ้งขาว โดยพบว่ามีอาการกินอาหารลดลง เปลือกน้่ม แพนหางแดง (Yu and Song, 2000) และพบจุดดำ (melanized) ที่เปลือกทั่วตัว เช่นเดียวกับรายงานของ Brock และคณะ (1997) ที่พบจุดดำที่เปลือกในกุ้งขาวระยะ juvenile ที่เป็นโรค Taura syndrome ในประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อนำกุ้งป่วยมาศึกษาทางจุลพยาธิสภาพ พบ intracytoplasmic inclusion bodies และมี necrosis ของ haemocyte ที่ lymphoid organ (Zarain-Herzberg and Acencio – Valle, 2001; Zarain-Herzberg, 2003) ส่วนในกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำที่เป็นโรค White spot syndrome นั้น มีอาการป่วยเช่นเดียวกัน แต่ไม่พบรอยโรคในกุ้งขาวที่ตรวจพบเชื้อ แต่พบรอยโรคลักษณะจุดขาวที่ได้เปลือกส่วนหัว (carapace) และเปลือกทั่วลำตัวในกุ้งกุลาดำ สอดคล้องกับรายงานของ Tapay และคณะ (1997) พบว่ากุ้งขาว (*P. vannamei*) และกุ้งฟ้า (*P. stylirostris*) ที่ติดเชื้อไวรัส White spot syndrome ไม่พบจุดขาวที่ได้เปลือกเช่นเดียวกันกับกุ้งกุลาดำและกุ้งลายเสือ (*P. japonicus*) ที่เป็นโรค White spot syndrome แต่ทำให้มีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาทางจุลพยาธิสภาพจากกุ้งป่วยที่เป็นโรค White spot syndrome พบ basophilic hypertrophied nuclei ที่เยื่อบุทั่วร่างกาย

การตรวจทางอณูชีววิทยา โดยเลือกใช้ Primer ที่ออกแบบขึ้นในครั้งนี้ คือ CUVET_Taura และนำเอาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ซึ่งเป็นส่วนของยีน VP1 ที่เป็นส่วนของ viral capsid ซึ่งมีความแตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์ ทำให้สามารถศึกษา phylogenetic relationship ของไวรัส Taura syndrome ได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสายพันธุ์ที่พบมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ไวรัสของประเทศไต้หวัน โดยมีความเหมือนกันมากกว่าสายพันธุ์จากอเมริกา และเม็กซิโกตามลำดับ เป็นไปได้ว่ากุ้งที่นำเข้ามาส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่มาจากประเทศไต้หวัน

เคยมีประวัติการระบาดของโรคนี้ แล้วมีการลักลอบนำเข้ากุ้งที่ไม่ได้มีการตรวจสอบว่าปลอดจากโรคหรือไม่ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โรค Taura syndrome ที่เป็นโรคในกุ้งแถบอเมริกา เข้ามาก่อนให้เกิดความเสียหายในกุ้งทวีปเอเชีย เช่นเดียวกับรายงานของ Yu และ Song (2000) ที่พบการระบาดครั้งแรกของ Taura syndrome ในประเทศไต้หวัน คาดว่ามาจากการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ที่ผิดกฎหมายจากประเทศปานามา หรือประเทศแถบอเมริกากลาง ทำให้ติดเชื้อในลูกกุ้งหรือเกิดการแพร่กระจายลงสู่แหล่งน้ำแล้วเกิดการแพร่ระบาดของโรค รวมถึงอาจติดจากกุ้งแช่แข็ง (frozen shrimp) ที่นำเข้าได้ โดยสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ โดยสายพันธุ์ไต้หวันมีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์อเมริกามากกว่าเม็กซิโก นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่าการแตกต่างของสายพันธุ์มากขึ้น โดยสายพันธุ์ไทยที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีวิวัฒนาการมาจากสายพันธุ์ไต้หวัน และสายพันธุ์ไต้หวันมีวิวัฒนาการมาจากสายพันธุ์ฮาวาย โดยพบว่าเชื้อไวรัสมีวิวัฒนาการเพิ่มขึ้น ต่างจากต้นแบบเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาที่รุนแรงมากขึ้นได้ ดังนั้นในการป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของโรคไวรัสภายในประเทศ ควรทำการคัดเลือกเฉพาะพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดจากโรค (specific pathogen free, SPF) เมื่อนำเข้ามาเลี้ยง และเมื่อนำมาพ่อแม่พันธุ์มาผลิตลูกกุ้ง ก็เป็นการช่วยลดการแพร่กระจายของโรคจากพ่อแม่สู่ลูกได้ (OIE, 2000) หรือในกรณีที่มีการนำเข้ากุ้งที่ไม่ทราบแหล่งที่ชัดเจน ควรทำการตรวจวินิจฉัยโรคตั้งแต่รุ่นพ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้า และตรวจซ้ำอีกครั้งในลูกกุ้ง จึงเป็นการป้องกันโรคได้ นอกจากนี้ในการจัดการฟาร์มก่อนและหลังการเลี้ยงนั้น ควรทำการตรวจซ้ำในลูกกุ้งที่นำไปเลี้ยงรวมถึงน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือสัตว์น้ำที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้ง โดยถ้าตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในกุ้งควรทำการคัดกุ้งในชุดนั้นๆ ออกทันที แต่ถ้าตรวจพบในน้ำ ต้องมีการบำบัดน้ำก่อนเพื่อป้องกันการเกิดโรคขึ้นได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้จะสมบูรณ์ได้ ก็ต่อเมื่อมีการหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของไวรัส Taura syndrome เพิ่มเติมในส่วนของยีน VP2 และ VP3 ด้วย เพื่อหาความแตกต่างของสายพันธุ์ Taura syndrome ในประเทศไทย ให้ชัดเจนขึ้น เนื่องจาก ยีน VP1 VP 2 และ VP3 เป็นส่วนของ Viral capsid ที่มีการปรับเปลี่ยนของพันธุกรรมของเชื้อไวรัส อาจทำให้ทราบข้อมูลของการวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส รวมถึงความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสให้มากขึ้น

ในส่วนของวิธีในการตรวจ อาจมีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้รวดเร็วมากขึ้นได้ โดยอาจพัฒนาเป็นการตรวจด้วยวิธี Multiplex PCR ออกแบบ Primer ที่เหมาะสม รวมถึงวิธีการสกัดสารพันธุกรรม เพื่อย่นระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัยโรคให้เร็วขึ้น และได้ผลแม่นยำมากที่สุด และพัฒนาการตรวจสอบสารพันธุกรรมในน้ำเลี้ยงกุ้งให้แม่นยำและรวดเร็วขึ้นด้วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กระทรวงเกษตร. กรมประมง, หน่วยสำรวจแหล่งประมง. 2512. สัตว์ทะเลที่เป็นอาหารของคนไทย. (ม.ป.ท.). 549.
- บรรจง เทียนสงฆ์ศรี. 2530. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. ชีววิทยาของกุ้งทะเล. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ อักษรเจริญทัศน์. 1 – 7.
- ประจวบ หล้าอุบล. 2533. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. กุ้ง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ นลิน. 51.
- พรเลิศ จันทร์วิฑูรชกุล ชะลอ ลี้มสุวรรณ สุปราณี ชินบุตร นิตี ชูเชิด เสรี ดอนแก้วบัว. 2540. การศึกษากาเกิดโรคและการป้องกันโรคดวงขาวในกุ้งกุลาดำ. รายงานการวิจัย พัฒนาและ วิศวกรรม. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2540.
- วรรณสิกา เกียรติปฐมชัย นุสรรา สิทธิดิถิกรัตน์ ศราวุฒิ จิตรภักดี วิชัย บุญแสง อัญชลี ทัศน ขจร. 2545. Genomics. จีนมกุ้ง. กรุงเทพฯ: ทางสะดวก. 139 – 140.
- วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2534. กุ้งกุลาดำ. กุ้งกุลาดำ. กรุงเทพฯ: โครงการเกษตรชุมชน. 5.
- สมปอง หิรัญวัฒน์. 2545. การติดตามเฝ้าระวังและมาตรการควบคุมปัญหาสารตกค้างในการเพาะ เลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง. 55(3): 255 – 258.
- สิริ ทุกชีวินาศ. 2545. ระบบรับรองคุณภาพกุ้งเลี้ยงของกรมประมง. วารสารการประมง. 55(3): 227 – 229.

ภาษาอังกฤษ

- Bonami, J.R., Hasson, K.W., Mari, J., Poulos, B.T., Lightner, D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp : characterization of the viral agent. Journal of General Virology. 78: 313-319.
- Brock, J.A., Gose, R., Lightner, D.V., Hasson, K. (1995). An overview of TS an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In : Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture'95. Browdy, C.L. and Hopkins, J.S. (eds.) World aquaculture Society . Louisiana . 84-94.

- Brock, J.A., Gose, R.B., Lightner, D.V., Hasson, K. (1997). Recent Developments and an Overview of Taura Syndrome of Farmed Shrimp in the Americas. In : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Flegel, T.W., MacRae, I.H. (eds.) Diseases in Asian Aquaculture III : Manila. 275-283.
- Chanratchakool, P. and Phillips, M.J. (2002). Social and economic impacts and management of shrimp disease among small – scale farmers in Thailand and Vietnam. In : Primary aquatic animal health care in rural, small – scale , aquaculture development. Arthur, M.J., Phillips, R.P., Subasinghe, R.P., Reantaso, M.B., MacRae, I.H. (eds.). FAO Fish. Tech. Pap. No. 406. 177-189.
- Chen, L.L., Leu, J.H., Huang, C.J., Chou, C.M., Chen, S.M., Wang, C.H., Lo, C.F., Kou, G.H. (2002). Identification of a Nucleocapsid Protein (VP35) Gene of Shrimp White Spot Syndrome Virus and Characterization of the Motif Important for Targeting VP35 to the Nuclei of Transfected Insect Cell. Virology. 293: 44 – 53.
- Elovaara, A.K. (2001). Shrimp farming manual Practical technology for intensive shrimp production. In: Taxonomy and characterization. Caribbean Press. 1-5.
- Erickson, H.S., Zarain-Herzberg, M., Lightner, D.V. (2002). Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods : diagnostic implications in penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 52: 1–10.
- Garza, J.R., Hasson, K.W., Poulos, B.T., Redman, R.M., White, B.L., Lightner, D.V. (1997). Demonstration of Infectious Taura Syndrome Virus in the Feces of Seagulls Collected during an Epizootics in Texas . Journal of Aquatic Animal Health . 9: 156-159.
- Gabriel, A.G. and Felipe, A.V. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Resent Res. Devl. Microbiology. 4: 333-348.
- Jory, D.E. (1999). Shrimp White spot Virus In the Western Hemisphere. Aquaculture Magazine.25(3): 83.

- Hameed, A.S.S., Murthi, B.L.M., Rasheed, M., Sathish, S., Yoganandhan, K., Muruga, V., Jayaraman, K. (2002). An investigation of *Artemia* as a possible vector for white spot syndrome virus (WSSV) transmission to *Penaeus indicus*. Aquaculture. 204: 1 –10.
- Hameed, A.S.S., Yoganandhan, K., Sathish, S., Rasheed, M., Muruga, V., Jayaraman, K. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*) . Aquaculture. 201 : 179 –186.
- Hasson, K.W., Hasson, J., Aubert, H., Redman, R.M., Lightner, D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. Journal of Virological Methods. 66: 227 - 236.
- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Mari, J., Bonami, J.R., Poulos, B.T., Mohny, L.L., Redman, R.M., Brock, J.A. (1999). The geographic distribution to Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histopathology and in situ hybridization using TSV- specific cDNA probes. Aquaculture. 171: 13 - 26.
- Jimenez, R., Barniol, R., de Barniol, L., Machuca, M., Romero, X. (2000). Viral – like particles associated with cuticular epithelium necrosis in cultured *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Crustacea) in Ecuador. Aquaculture Research. 31: 519 – 528.
- Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S., Itami, T. (1998). Detection of white-spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: Microscopic observation and polymerase chain reaction. Aquaculture. 164: 243 – 251.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Hasson, K.W., Pantoja, C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea : Decapoda) : gross signs, histopathology and ultrastructure. Dis. Aquat. Org. 21: 53 – 59.
- Lightner, D.V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured Penaeid shrimp. World Aquaculture society. 158.

- Lightner, D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSS, IHNV, WSSV and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. J. Appl. Aquaculture. 9: 27 – 52.
- Lightner, D.V. and Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164: 201 – 220.
- Liu, W.J., Yu, H.T., Peng, S.E., Chang, Y.S., Pien, H.W., Lin, C.J., Huang, C.J., Tsai, M.F., Huang, C.J., Wang, C.H., Lin, J.Y., Lo, C.F., Kou, G.H. (2001). Cloning, Characterization, and Phylogenetic Analysis of a Shrimp White Spot Syndrome Virus gene That Encodes a Protein Kinase. Virology. 289: 362 – 377.
- Lotz, J.M. (1997). Effect of host size on virulence of Taura Virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea : Penaeidae). Dis. Aquat. Org. 30: 45 – 51.
- Lotz, J.M., Soto, M.A. (2002). Model of white spot syndrome virus (WSSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. Dis Aquat Org. 50: 199 – 209.
- Magbanua, F.O., Natividad, K.T. , Migo, V.P., Alfafara, C.G., de la Peña, F.O. , Miranda, R.O., Albaladejo, J.D., Nadala Jr, E.C.B. ,Loh, P.C., Mahilum-Tapay, L. (2000). White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. Dis Aquat Org. 42: 77 – 82.
- Manivannan, S., Otta, S.K., Karunasagar, I. (2002). Multiple viral infection in *Penaeus monodon* shrimp postlarvae in an Indian hatchery. Dis Aquat Org. 48: 233 – 236.
- Mari, J., Poulos, B.T., Lightner, D.V., Bonami, J.R. (2002). Shrimp Taura syndrome of virus: genomic characterization and similarity with members of the genus *Cricket paralysis*-like viruses. Journal of General Virology. 83: 915-926.
- Mayo, M.A. (2002). A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Arch. Virol. 147(8): 1655 – 1656.
- Morales-Covarrubias, M.S. and Chavez-Sanchez, C. (1999). Histopathological Studies on Wild Broodstock of White Shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos Area, Adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. Journal of the world aquaculture society. 30(2): 192 - 200.

- Office International des Epizootics(OIE). (2000). OIE Aquatic Animal Disease Cards.
Office International des Epizootics. Paris.
- Office International des Epizootics(OIE). (2003). OIE Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals. 4th ed. Office International des Epizootics. Paris. 275 – 297.
- Rodríguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., de Blas, I., Alday, V., Calderón, J. (2003). White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. Journal of fish disease. 26: 439 – 450.
- SEAFDEC. (2002). Promising strategied against WSSV for kuruma shrimp in Japan. Asian Aquaculture.24(3): 9 – 10.
- Supamattaya, K., Hoffman, R., Boonyaratpalin, S., Kanchanaphun, P. (1997). Experimental transmission of White Spot Baculovirus (WSBV) from Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to the Portunid Crab(*Portunus pelagicus*), Mud crab (*Scylla serratia*) and Krill (*Acetes* sp.). สัมมนาวิชาการเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 121 – 131.
- Solis, N.B. (1988). Biology and Ecology. In : Biology and culture of *Penaeus monodon*. Lacanilao, F.J. (ed.). Iloilo: Aquaculture Department Southeast Asian Fisheries Development center. 3 – 9.
- Song, Y.L., Yu, C.I., Lien, T.W., Huang, C.C., Lin, M.N. (2003). Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology. 14: 317-331.
- Stern, S. (1995). Swimming through troubled waters in shrimp farming : Ecuador country review. In : Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture'95. Browdy, C.L. and Hopkins, J.S. (eds.). World aquaculture Society. Lousiana . 35-39.

- Tapay, L.M., Lu, Y., Gose, R.B., Brock, J.A., Loh, P.C. (1997). Infection of White-spot Baculovirus-like Virus (WSBV) in Two Species of Penaeid Shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *P.vannamei* (Boone). In : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Flegel, T.W., MacRae, I.H. (eds.) Diseases in Asian Aquaculture III : Manila. 297 - 302.
- Tsai, M.F., Lo, C.F., van Hulten, M.C.W., Tzeng, H.F., Chou, C.M., Huang, C.J., Wang, C.H., Lin, J.Y., Vlak, J. M., Kou, G.H. (2000). Transcriptional Analysis of the Ribonucleotide Reductase Genes of Shrimp White Spot Syndrome Virus. Virology. 277: 92 – 99.
- Tsai , M.F., Yu, H.T., Tzeng, H.F., Leu, J.H., Chou, C.M., Huang, C.J., Wang, C.H., Lin , J.Y., Kou, G.H., Lo, C.F. (2000). Identification and Characterization of a Shrimp White Spot Syndrome Virus (WSSV) Gene that Encodes a Novel Chimeric Polypeptide of Cellular-Type Thymidine Kinase and Thymidylate Kinase. Virology. 277: 100 - 110.
- van Hulten, M.C.W., Tsai, M.J., Schipper, C.A., Lo, C.F., Kou, G.H., Vlak, J.M. (2000). Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. Journal of General Virology. 81: 307 - 316.
- van Hulten, M.C.W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Lankhorst, R.K., Vlak, J.M. (2001). The white spot syndrome virus DNA genome sequence. Virology. 286: 7 – 22.
- Wang, Y. T., Liu, W., Seah, J. N., Lam, C. S., Xiang, J. H. , Korzh, V., Kwang, J. (2002). White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. Dis Aquat Org. 52: 249 – 259.
- Wongtavatchai, J., Sarikaputi, M., Viseshakul, N., Chaisiri, N., Tangtrongpiros, R., Ratanapani, R. (2003). Comparisons on DNA preparation for the PCR detection of White spot syndrome virus (WSSV) in Crab tissue (*Sesarma* spp.). Proceeding in the 11th international symposium of the world association of veterinary laboratory diagnosticians and OIE seminar on biotechnology. 137-138.

- Wongteerasupaya, C., Wongwisansri, S., Boonsaeng, V., Panyim, S., Pratanpipat, P., Nash, G.L., Withyachumnankul, B., Flegel, T.W. (1996). DNA fragment of *Penaeus monodon* baculovirus PmNOBII gives positive in situ hybridization with white-spot viral infections in six penaeid shrimp species. Aquaculture. 143: 23-32.
- Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X., Xu, X. (2001). Complete Genome Sequence of the Shrimp White Spot Bacilliform Virus. Journal of Virology. 75(23) : 11811-11820.
- Yoganandhan, K., Narayanan, R.B. and Hameed, A.S.S. (2003). Larvae and early post-larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius) experiment infected with white spot syndrome virus (WSSV) show no significant mortality . Journal of Fish Disease. 26: 385-391.
- Yu C.I. and Song, Y.L. (2000). Outbreaks of Taura Syndrome in Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei* Cultured in Taiwan . Fish Pathology. 35(1): 21 - 24.
- Zarain-Herzberg, M., Acencio – Valle, F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow – up study in shrimp farms of Sinaloa. Aquaculture. 193: 1 – 9.
- Zarain-Herzberg, M. (2003). Biological Characterization of a Less Virulent Taura Syndrome in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) : Gross signs, Histopathological Lesions, and Mortalities. Journal of the World Aquaculture Society. 34(1): 99 – 105.
- Zhan, W.B., Wang, Y.H., Fryer, J.L., Yu, K.K., Meng, Q.X. (1998). White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. Journal of Aquatic Animal Health. 10: 405 – 410.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

เครื่องหมายการค้า

- | | |
|---|--|
| 1. Absolute ethanol (C ₂ H ₅ OH) | Merck |
| 2. Ampicillin | BIO BASIC Inc. |
| 3. Bacto [®] Luria Bertani agar | Becton Dickinson
Microbiology Systems |
| 4. Bacto [®] Luria Bertani broth | Becton Dickinson
Microbiology Systems |
| 5. Boric acid (H ₃ BO ₃) | Merck |
| 6. Bromophenol blue | Sigma |
| 7. Competent cell (ECOS 101) | Yeastern Biotech Co.,Ltd. |
| 8. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) | Invitrogen |
| 9. Ethylene diaminetetra acetic acid (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O) | Sigma |
| 10. Ethidium Bromide(2,7 – Diamino – 10 – ethyl – 9 – phenylphenanthridinium) | Sigma |
| 11. Formalin | Sigma |
| 12. Glacial acetic acid | Sigma |
| 13. Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃) | Carlo erba reagent |
| 14. Isopropyl - β - D – Thiogalactopyranoside | BIO BASIC Inc |
| 15. Low EEO Agarose gel | BIO 101,Inc. |
| 16. M23 100 bp + 1.5 kb DNA ladder | SibEnzyme |
| 17. N, N – Dimethyl formamide (C ₃ H ₇ NO) | BIO BASIC Inc |
| 18. PCR test kit | Invitrogen |
| 19. pGEM – T Easy [®] Vector System I | Promega |
| 20. QIAamp RNA blood Mini kit | QIAGEN |
| 21. QIA quick PCR Purification Kit | QIAGEN |
| 22. Sodium hydroxide (NaOH) | Merck |
| 23. SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum [®] Taq | Invitrogen |
| 24. Tris base (NH ₂ (CH ₂ OH) ₃) | USB |
| 25. Xylene cyanol FF (C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₆ S ₂ Na) | Sigma |
| 26. 5 – Bromo – 4 – Chloro – 3 – Indolyl - β - D – Galactopyranoside | BIO BASIC Inc. |

วิธีในการทำ 0.5 X TBE Buffer

ชั่ง 0.1 M Tris Base (USB[®], USA) 54 กรัม และกรดบอริก (Merck[®], Germany) 27.5 กรัม ผสมกับ 0.5M EDTA (Sigma[®], USA) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด ต่างให้ได้เท่ากับ 8 ด้วย NaOH (Merck[®], Germany) หลังจากนั้นเติมน้ำ ultrapure จนครบ 1,000 มิลลิลิตร

วิธีในการทำสารละลาย EDTA (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ · 2H₂O)

เตรียม 0.5 M EDTA ที่ความเป็นกรด ต่างเท่ากับ 8 โดยนำ 1 M EDTA (Sigma[®], USA) มา 186.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นวัดความเป็นกรด ต่างให้ได้เท่ากับ 8 โดยถ้าน้อยกว่า 8 ให้ปรับค่าความเป็นกรด ต่างด้วย NaOH (Merck[®], Germany) แต่ถ้ามากกว่า 8 ให้ปรับด้วย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

วิธีในการทำ 2% agarose gel

ชั่ง agarose gel (BIO BASIC Inc., USA) 1 กรัม ละลายใน 0.5 X TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ชวนให้ร้อนอ่อนตัวแล้ว เทลงใน gel caster รอจนแข็งแล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง electrophoresis ต่อไป

วิธีในการทำ Loading Buffer

นำ bromophenol blue (Sigma[®], USA) 0.025 กรัม และ xylene cyanol FF (Sigma[®], USA) 0.025 กรัม ละลายใน glycerol (Carbo erba reagent, USA) 3 มิลลิลิตรให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ต่อไป

วิธีในการทำ DNA ladder

นำ 100 bp DNA ladder (SibEnzyme[®], USA) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่เก็บในสารละลาย 10mM Tris-HCl, pH 8 และ 1 mM EDTA มาในปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 5 ไมโครลิตร และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ต่อไป

วิธีในการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacto[®] Luria Bertani broth

ชั่ง Luria Bertani broth medium (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1.8 มิลลิลิตร/ 1 หลอด และนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาผสม ampicillin (BIO BASIC INC., USA) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

วิธีในการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacto® Luria Bertani agar

ชั่ง Luria Bertani agar medium (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) 35 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 18 มิลลิลิตร/ 1 หลอด และนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาผสม ampicillin (BIO BASIC INC.) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

วิธีในการเตรียม Ampicillin

ทำ Stock solution โดยชั่ง ampicillin (BIO BASIC Inc., USA) 0.09 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นทำ ten-fold dilution ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายยา ampicillin (BIO BASIC Inc., USA) ที่มีความเข้มข้นที่ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มา 2 มิลลิลิตร ละลายใน Luria Bertani agar medium (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) 18 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani broth (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) นั้น ทำได้โดยนำสารละลายยา ampicillin (BIO BASIC Inc., USA) ที่มีความเข้มข้นที่ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มา 0.2 มิลลิลิตร ละลายใน Luria Bertani broth medium (Becton Dickinson Microbiology Systems, USA) 1.8 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเช่นเดียวกัน

วิธีในการเตรียม X – gal (5 – Bromo – 4 – Chloro – 3 – Indolyl - β - D – Galactopyranoside)

ชั่ง X- gal (BIO BASIC Inc., USA) 50 มิลลิกรัม ละลายใน N, N – Dimethyl formamide (C₃H₇NO) (BIO BASIC Inc., USA) 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นห่อ eppendorf ด้วย aluminium foil และเก็บที่ – 20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

วิธีในการเตรียม IPTG (Isopropyl - β - D – Thiogalactopyranoside)

ชั่ง 0.1 M IPTG (BIO BASIC Inc., USA) 0.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร แบ่งใส่ Sterile eppendorf หลังจากนั้นนำ Eppendorf ไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

วิธีในการเตรียม Davidson's fixative

นำ 100% formalin (Sigma®, USA) ปริมาณ 220 มิลลิลิตร, 95% ethanol ปริมาณ 330 มิลลิลิตร, glacial acetic acid (Sigma®, USA) ปริมาณ 115 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 335 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงข้อมูลเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของตัวอย่างกุ้งที่ทำการเก็บตัวอย่างในการศึกษา

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของตัวอย่างกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสจาก
จังหวัดสมุทรสาคร ตรวจเมื่อวันที่ 12 เดือนกันยายน พ.ศ.2546

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			น้ำหนักตัว(กรัม)			ผลการตรวจตัวอย่าง	
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	X ± SD	Range	% CV	TS	WSS
A 1.	Lv	40	10	3.25 ± 0.661	2.26 – 3.973	20.35	-	-
2.	Lv	40	10	2.656 ± 0.651	1.747 – 3.579	24.52	-	-
3.	Lv	40	10	2.188 ± 0.569	1.023 - 2.924	26.02	-	-
4.	Lv	40	10	1.557 ± 0.545	1.121 – 2.529	35.02	-	-

หมายเหตุ : Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
- หมายถึง ผล negative

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของตัวอย่างกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสจาก
จังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจเมื่อวันที่ 10 เดือนตุลาคม พ.ศ.2546

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			น้ำหนักตัว(กรัม)			ผลการตรวจตัวอย่าง	
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	X ± SD	Range	% CV	TS	WSS
B 5.	Lv	35	10	2.599 ± 0.734	0.62 – 3.32	28.25	-	-
6.	Lv	35	10	1.02 ± 0.529	0.15 – 1.59	51.84	+	-
7.	Lv	35	10	2.39 ± 0.905	0.24 – 3.38	37.88	-	-
8.	Lv	35	10	2.208 ± 0.800	0.68 – 3.42	36.27	-	-
9.	Lv	35	10	2.364 ± 0.82	0.53 – 3.146	34.68	-	-
10.	Lv	35	10	2.524 ± 0.637	0.78 – 3.27	25.23	-	-

หมายเหตุ : Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
+ หมายถึง ผล positive
- หมายถึง ผล negative

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของตัวอย่างกุ้งขาวที่ติดเชื้อไวรัสจาก
จังหวัดชุมพร ตรวจสอบเมื่อวันที่ 13 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2546

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			น้ำหนักตัว(กรัม)			ผลการตรวจตัวอย่าง	
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	X ± SD	Range	% CV	TS	WSS
C 11.	Lv	60	20	6.44 ± 1.227	5.012 – 7.994	19.05	-	-
12.	Lv	60	20	6.285 ± 1.349	4.358 – 7.957	21.47	-	-
13.	Lv	60	20	6.094 ± 1.232	4.889 – 7.895	20.22	-	-
14.	Lv	60	20	6.053 ± 7.981	4.433 – 7.981	20.41	-	-
15.	Lv	60	20	6.366 ± 1.222	5.125 – 8.174	19.2	-	-
16.	Lv	60	20	7.008 ± 1.381	5.023 – 8.523	19.71	-	-

หมายเหตุ : Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
- หมายถึง ผล negative

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของตัวอย่างกุ้งกุลาดำ ที่ติดเชื้อไวรัสจาก
จังหวัดตราด ตรวจสอบเมื่อวันที่ 1 เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2547

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			น้ำหนักตัว(กรัม)			ผลการตรวจตัวอย่าง	
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	X ± SD	Range	% CV	TS	WSS
D 17.	Pm*	20	20	0.551 ± 0.198	0.294 – 0.935	35.99	-	-
18.	Pm*	20	20	0.507 ± 0.211	0.254 – 0.842	41.64	-	+
19.	Pm*	30	20	2.217 ± 0.819	1.051 – 3.962	36.94	-	-
20.	Pm	100	20	13.312 ± 2.757	10.62 – 18.132	20.70	-	+
21.	Lv	30	20	1.485 ± 0.741	0.703 – 3.15	49.89	-	-

หมายเหตุ : Pm หมายถึง *Penaeus monodon*
Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
+ หมายถึง ผล positive
- หมายถึง ผล negative
* อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 400,000 ตัว/5 ไร่

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์สัมพันธภาพความแปรปรวนของตัวอย่างกุ้งกุลาดำ ที่ติดเชื้อไวรัสจาก
จังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจเมื่อวันที่ 1 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง		น้ำหนักตัว(กรัม)			ผลการตรวจตัวอย่าง		
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	X ± SD	Range	% CV	TS	WSS
E 22.	Lv	30	20	1.284 ± 0.473	0.11 - 2.42	36.80	+	-
23.	Pm*	50	20	1.568 ± 0.537	1.08 - 2.4	34.26	+	-
24.	Pm*/∇	50	20	2.011 ± 1.096	0.29 - 3.62	54.51	+	-
25.	Lv***/∇	40	20	1.678 ± 0.656	1.09 - 2.68	39.08	-	-
26.	Pm**/∇∇	50	20	1.806 ± 0.539	1.14 - 3.19	29.86	+	+
27.	Lv***/∇∇	40	20	2.569 ± 0.07	2.4 - 2.65	2.73	-	-

หมายเหตุ : Pm หมายถึง *Penaeus monodon*
 Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
 + หมายถึง ผล positive
 - หมายถึง ผล negative
 * อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 700,000 ตัว/5 ไร่
 ** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 500,000 ตัว/5 ไร่
 *** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 900,000 ตัว/5 ไร่
 ∇, ∇∇ เลี้ยงร่วมกันในบ่อเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์สัดส่วนความแปรปรวนของตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจาก
จังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจสอบเมื่อวันที่ 10 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			น้ำหนักตัว(กรัม)			ผลการตรวจตัวอย่าง	
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	$X \pm SD$	Range	% CV	TS	WSS
F 28.	Lv****	40	20	2.373 \pm 0.599	1.05 – 3.35	25.23	-	+
29.	Lv****	40	20	2.849 \pm 1.381	0.505 – 2.485	48.48	+	+
30.	Pm*/ ∇	60	20	4.16 \pm 1.444	2.31 – 6.27	34.71	+	+
31.	Lv**/ ∇	50	20	4.795 \pm 0.812	3.78 – 6.03	16.94	-	+
32.	Pm*/ $\nabla\nabla$	60	20	3.032 \pm 1.685	1.067 - 5.896	55.57	-	+
33.	Lv***/ $\nabla\nabla$	50	20	3.891 \pm 1.792	1.16 – 5.87	46.04	-	+
34.	Pm**/ $\nabla\nabla\nabla$	60	20	2.725 \pm 0.925	1.4 – 5.2	33.96	+	+
35.	Lv***/ $\nabla\nabla\nabla$	50	20	3.76 \pm 0.904	1.73 – 5.21	24.04	-	+

หมายเหตุ : Pm หมายถึง *Penaeus monodon*
 Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
 + หมายถึง ผล positive
 - หมายถึง ผล negative
 * อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 700,000 ตัว/5 ไร่
 ** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 500,000 ตัว/5 ไร่
 *** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 900,000 ตัว/5 ไร่
 **** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 750,000 ตัว/5 ไร่
 ∇ , $\nabla\nabla$, $\nabla\nabla\nabla$ เลี้ยงร่วมกันในบ่อเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์สหสัมพันธ์ความแปรปรวนของตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสจาก
จังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจสอบเมื่อวันที่ 13 เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			น้ำหนักตัว(กรัม)			ผลการตรวจตัวอย่าง	
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	X ± SD	Range	% CV	TS	WSS
H 37.	Lv*	48	10	3.25 ± 1.937	0.456 – 4.994	59.59	+	+
38.	Lv*	48	10	2.688 ± 1.378	1.354 - 4.309	51.27	-	-
39.	Lv**	28	10	0.305 ± 0.362	0.121 – 1.201	118.83	+	-

หมายเหตุ : Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
 + หมายถึง ผล positive
 - หมายถึง ผล negative
 * อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 480,000 ตัว/5 ไร่
 ** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 1,500,000 ตัว/5 ไร่

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงข้อมูลผลการตรวจพันธุกรรมไวรัสของTaura syndrome และ White spot syndromeของตัวอย่างกุ้งและน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยง

ตารางที่ 1 สรุปการตรวจตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจเมื่อวันที่ 1 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง		ผลการตรวจตัวอย่าง		ผลการตรวจตัวอย่างน้ำเลี้ยง		
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	TS	WSS	TS	WSS
E 22.	Lv	30	20	+	-	+	-
23.	Pm	50	20	+	+	+	-
27.	Lv	40	20	+	-	+	-

หมายเหตุ : Pm หมายถึง *Penaeus monodon*
Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
+ หมายถึง ผล positive
- หมายถึง ผล negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 สรุปการตรวจตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจเมื่อวันที่ 10 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง			ผลการตรวจตัวอย่าง		ผลการตรวจตัวอย่างน้ำเลี้ยง	
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	TS	WSS	TS	WSS
F 28.	Lv****	40	20	-	+	+	+
29.	Lv****	40	20	+	+	+	+
30.	Pm*/∇	60	20	+	+	+	+
31.	Lv**/∇	50	20	-	+	+	+
32.	Pm*/∇∇	60	20	-	+	+	+
33.	Lv***/∇∇	50	20	-	+	+	+
34.	Pm**/∇∇∇	60	20	+	+	+	+
35.	Lv***/∇∇∇	50	20	-	+	+	+

หมายเหตุ : Pm หมายถึง *Penaeus monodon*
 Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
 + หมายถึง ผล positive
 - หมายถึง ผล negative
 * อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 700,000 ตัว/5 ไร่
 ** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 500,000 ตัว/5 ไร่
 *** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 900,000 ตัว/5 ไร่
 **** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 750,000 ตัว/5 ไร่
 ∇, ∇∇, ∇∇∇ เลี้ยงร่วมกันในบ่อเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 สรุปการตรวจตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจเมื่อวันที่ 13
เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547

ตัวอย่าง ชุด / ID	กุ้ง		ผลการตรวจตัวอย่าง		ผลการตรวจตัวอย่างน้ำเลี้ยง		
	ชนิด	อายุ (วัน)	จำนวน (ตัว)	TS	WSS	TS	WSS
H 37.	Lv*	48	10	+	+	+	-
38.	Lv*	48	10	-	-	+	-
39.	Lv**	28	10	+	-	+	-

หมายเหตุ : Lv หมายถึง *Litopenaeus vannamei*
 + หมายถึง ผล positive
 - หมายถึง ผล negative
 * อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 480,000 ตัว/5 ไร่
 ** อัตราการปล่อยลูกกุ้งเท่ากับ 1,500,000 ตัว/5 ไร่

ตารางที่ 4 สรุปการตรวจตัวอย่างน้ำเพาะเลี้ยงกุ้งจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจเมื่อวันที่ 13
เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547 จากบ่อพักในฟาร์ม

บ่อ	ผลการตรวจตัวอย่างน้ำเลี้ยง	
	TS	WSS
บ่อพัก	+	-

หมายเหตุ : + หมายถึง ผล positive
 - หมายถึง ผล negative

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบผลการตรวจน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงจากบ่อเดียวกันแต่เป็นกุ้งที่เลี้ยงคนละชุดกัน จากฟาร์มเดียวกันในจังหวัดฉะเชิงเทรา ตรวจเมื่อวันที่ 10 มีนาคม พ.ศ.2547 และ 13 กรกฎาคม พ.ศ.2547

10 มีนาคม 2547			13 กรกฎาคม 2547				
ตัวอย่าง ชุด / ID	TS	WSS	ตัวอย่าง ชุด / ID	TS	WSS	น้ำบ่อพัก	
						TS	WSS
F 28.	+	+		NA	NA	+	-
29.	+	+		NA	NA		
30.	+	+		NA	NA		
31.	+	+	H 37.	+	-		
32.	+	+		NA	NA		
33.	+	+	38.	+	-		
34.	+	+		NA	NA		
35.	+	+	39.	+	--		

หมายเหตุ : NA หมายถึง ไม่มีตัวอย่าง
 + หมายถึง ผล positive
 - หมายถึง ผล negative

F31 และ H37 : ตัวอย่างกึ่งจากรุ่นการเลี้ยงที่ต่างกัน แต่บ่อเลี้ยงเดิม

F33 และ H38 : ตัวอย่างกึ่งจากรุ่นการเลี้ยงที่ต่างกัน แต่บ่อเลี้ยงเดิม

F35 และ H39 : ตัวอย่างกึ่งจากรุ่นการเลี้ยงที่ต่างกัน แต่บ่อเลี้ยงเดิม

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

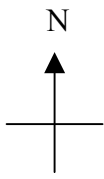
ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลการตรวจคุณภาพน้ำเลี้ยงกุ้งจากฟาร์ม

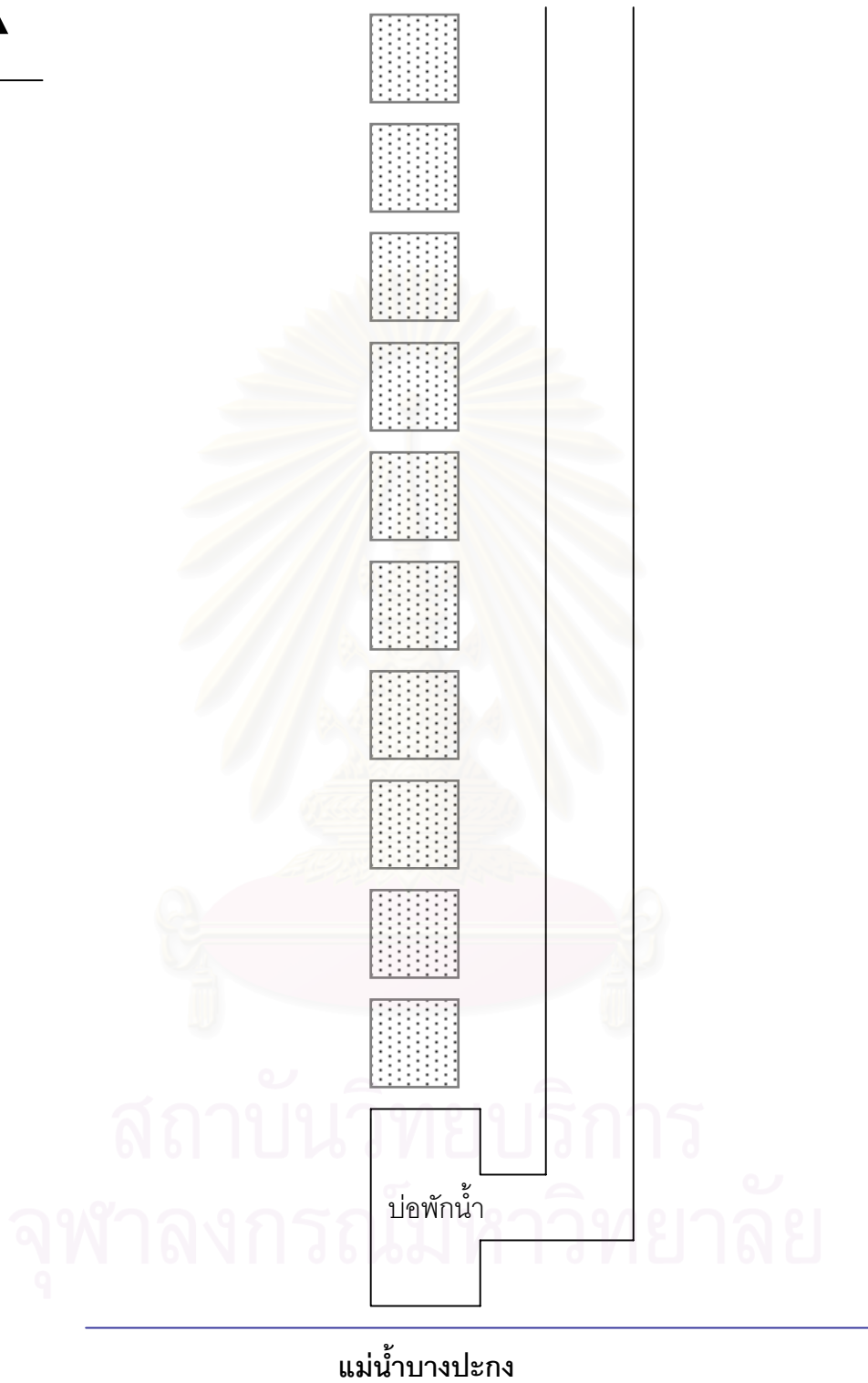
ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจคุณภาพน้ำในบ่อจากฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทรา
ในช่วงระยะเวลาของการศึกษา (ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

	ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
การวิเคราะห์ทางกายภาพ	
ความโปร่งแสงของน้ำ (cm)	35.5 \pm 7.09
การวิเคราะห์ทางเคมี	
- ความเค็ม (ppt)	7.33 \pm 0.58
- ออกซิเจนละลายในน้ำ (ppm)	8.16 \pm 2.47
- อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	30.33 \pm 0.58
- ความเป็นกรด ต่าง	8.17 \pm 0.51
- ค่าสภาพต่าง (Total alkalinity) (มก. ของ CaCO ₃ / ลิตร)	94.67 \pm 34.96
- ความกระด้าง (Hardness) (มก. ของ CaCO ₃ / ลิตร)	3655 \pm 1105
- ปริมาณแอมโมเนีย (มก. ของ NH ₃ -N/ ล.)	0.1 \pm 0.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



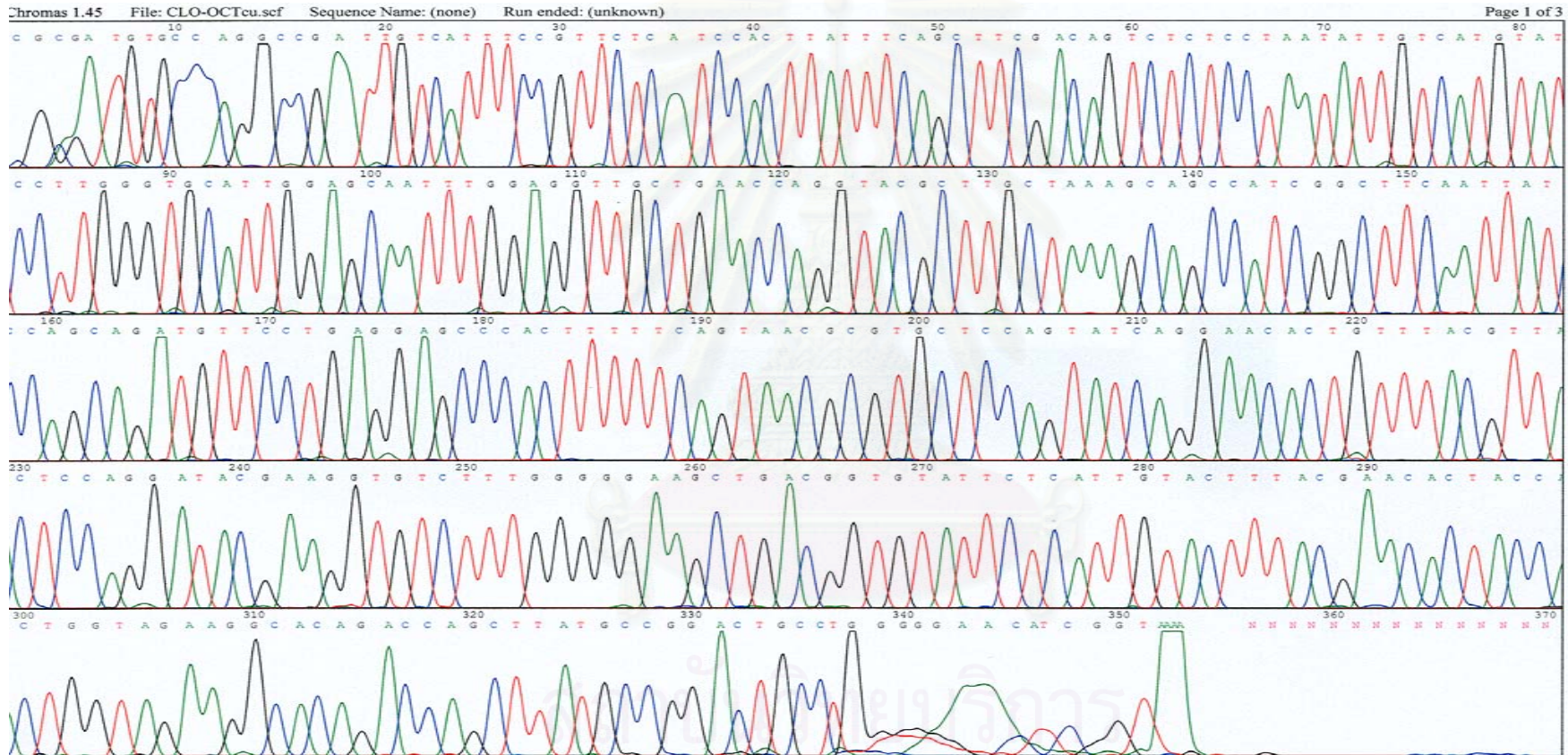
ภาคผนวก จ



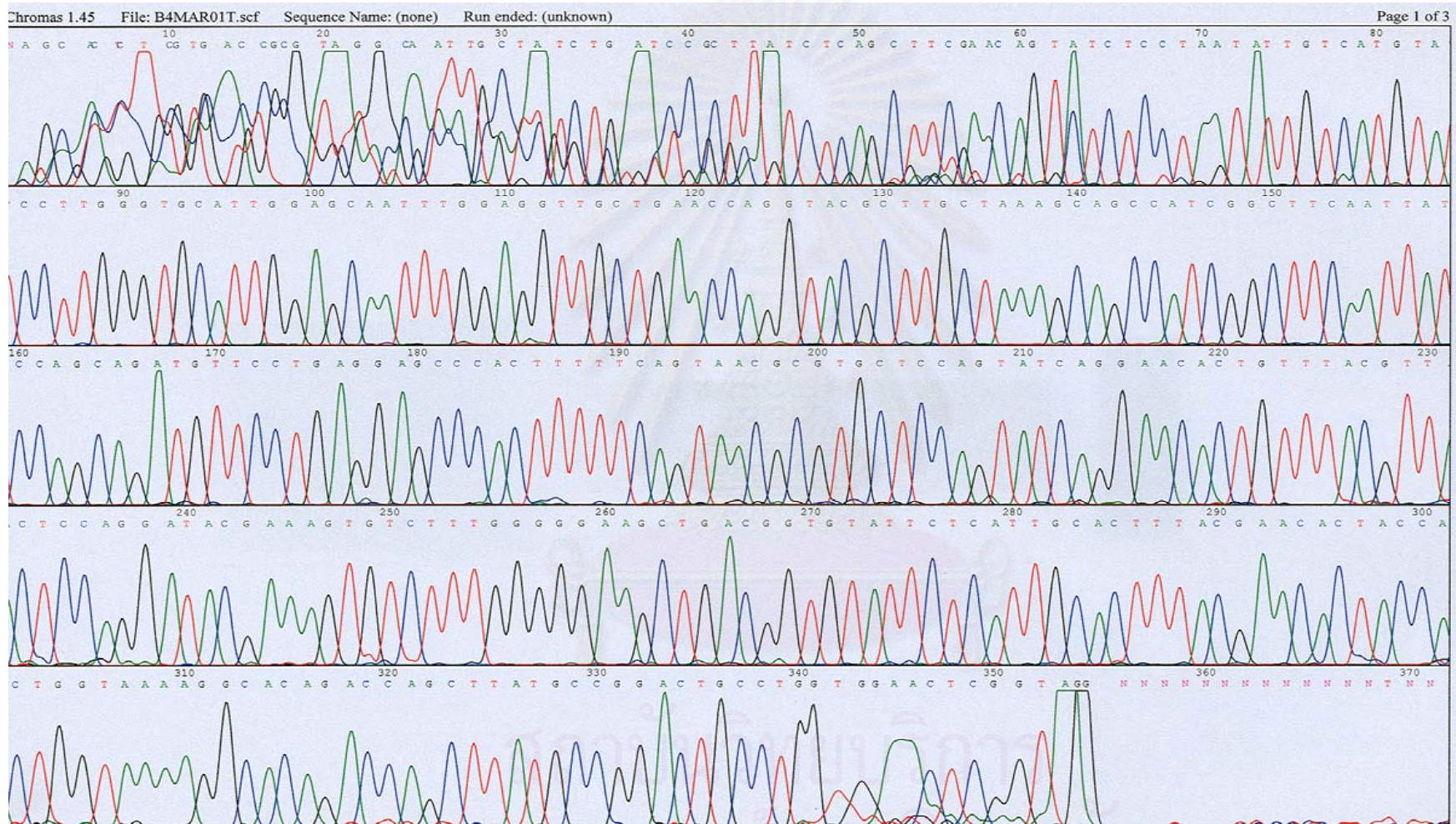
รูปที่ 1 แสดงแผนผังฟาร์มในจังหวัดฉะเชิงเทราที่ทำการตรวจการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส Taura syndrome และ White spot syndrome

หมายเหตุ :  แสดง บ่อเลี้ยงกุ้ง

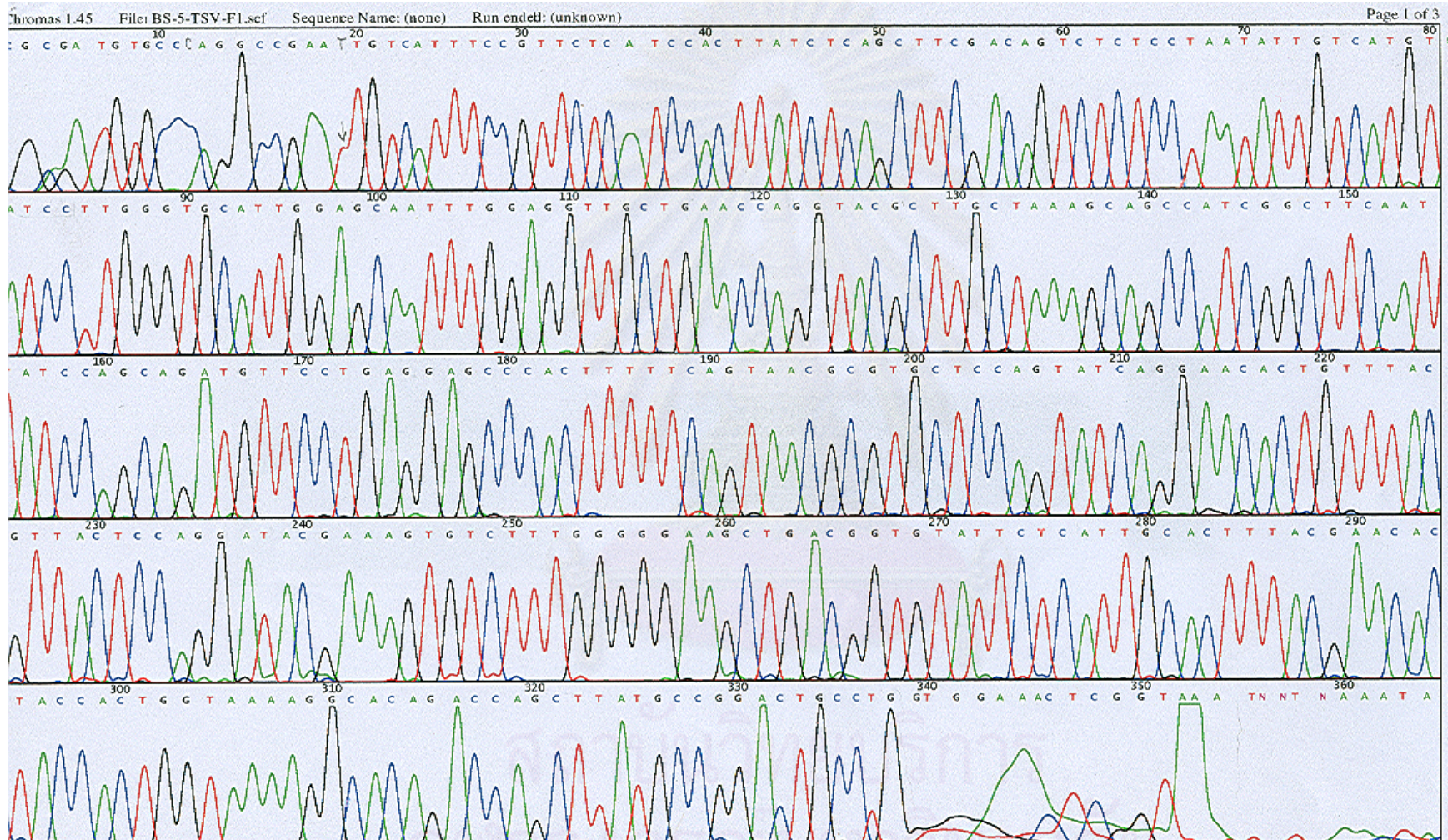
ภาคผนวก ฉ



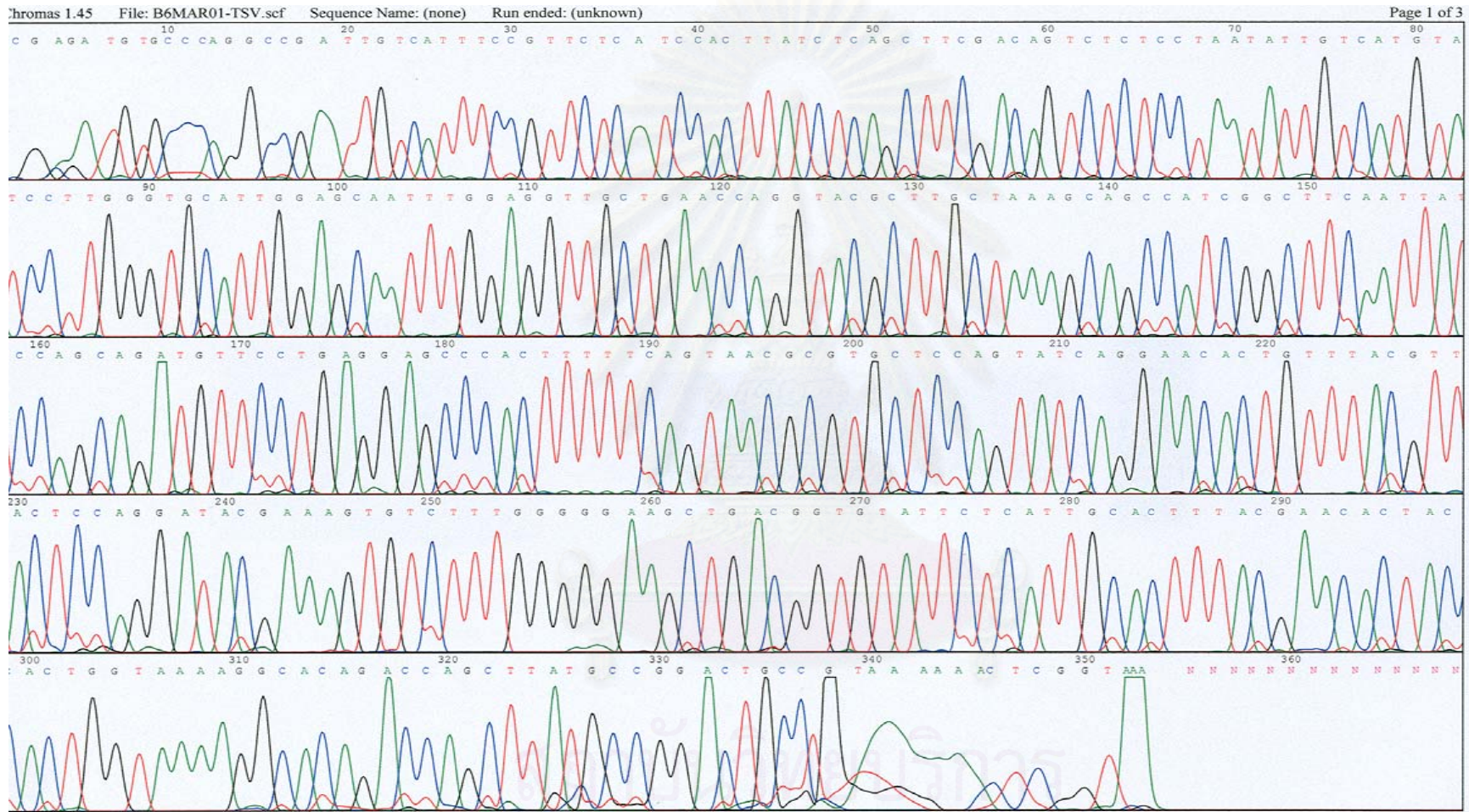
รูปที่ 1 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2546 (ให้ชื่อว่า CLO_OCTcu)



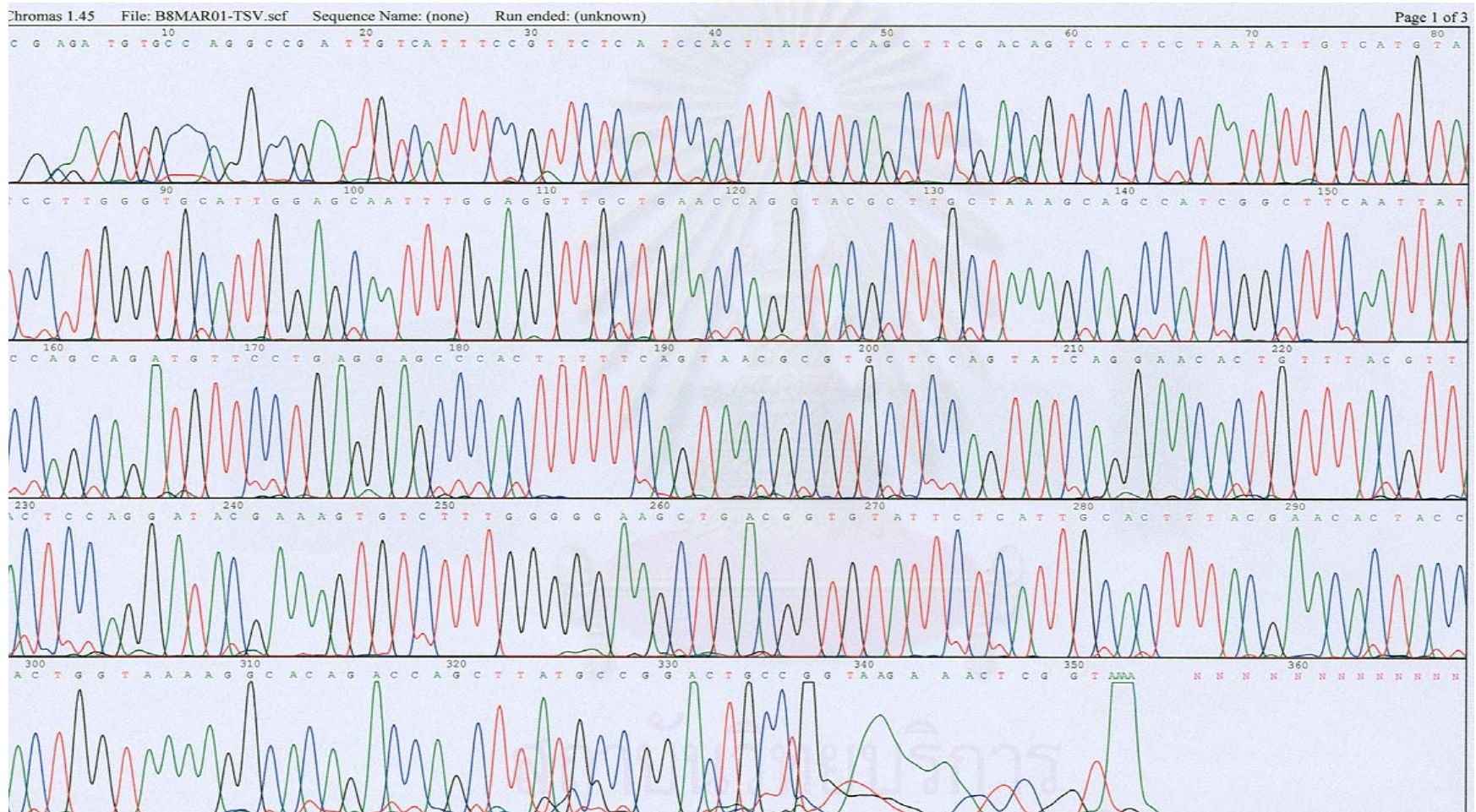
รูปที่ 2 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2547 (ให้ชื่อว่า B4MAR01T)



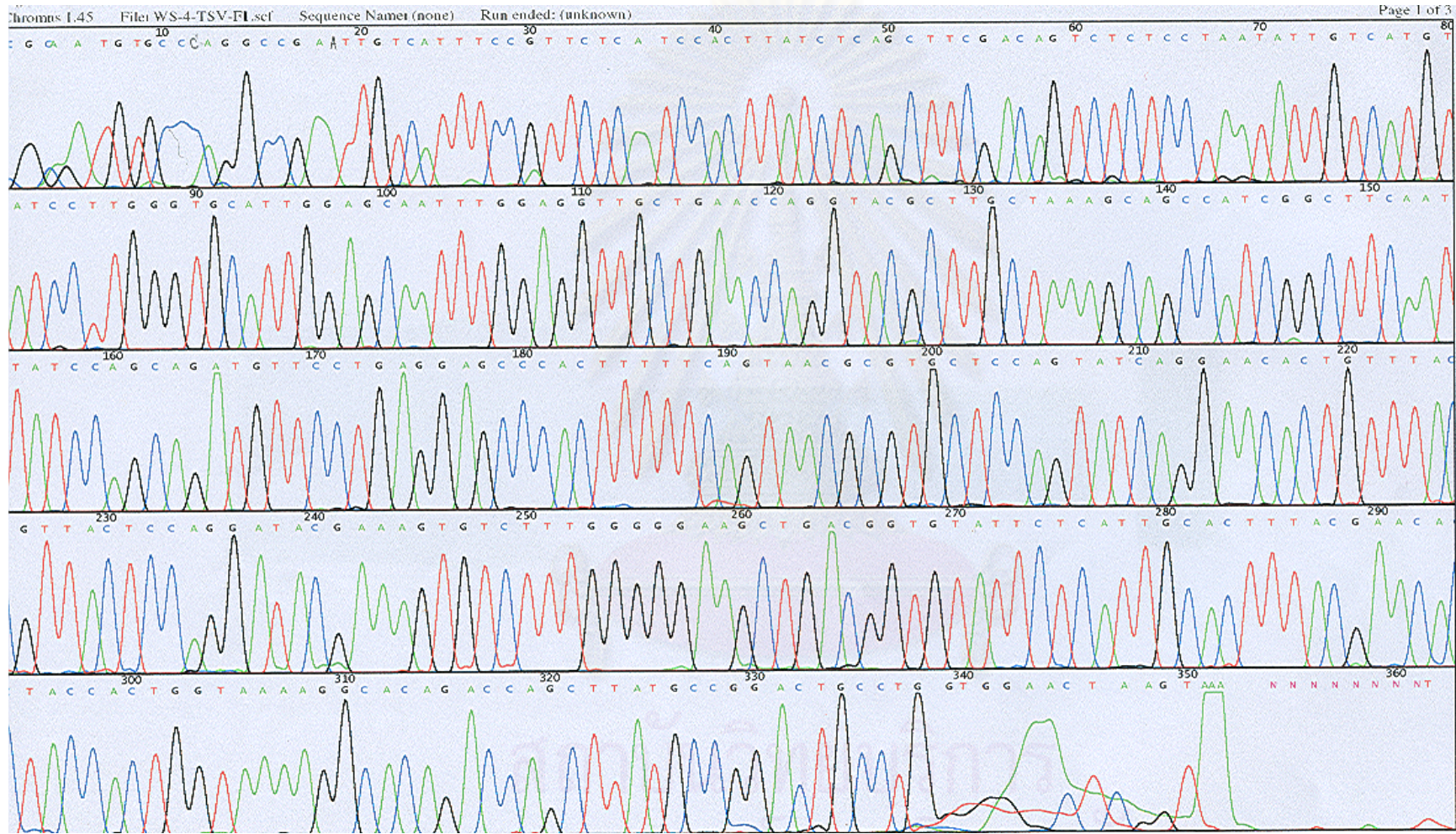
รูปที่ 3 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า BS5_TSV)



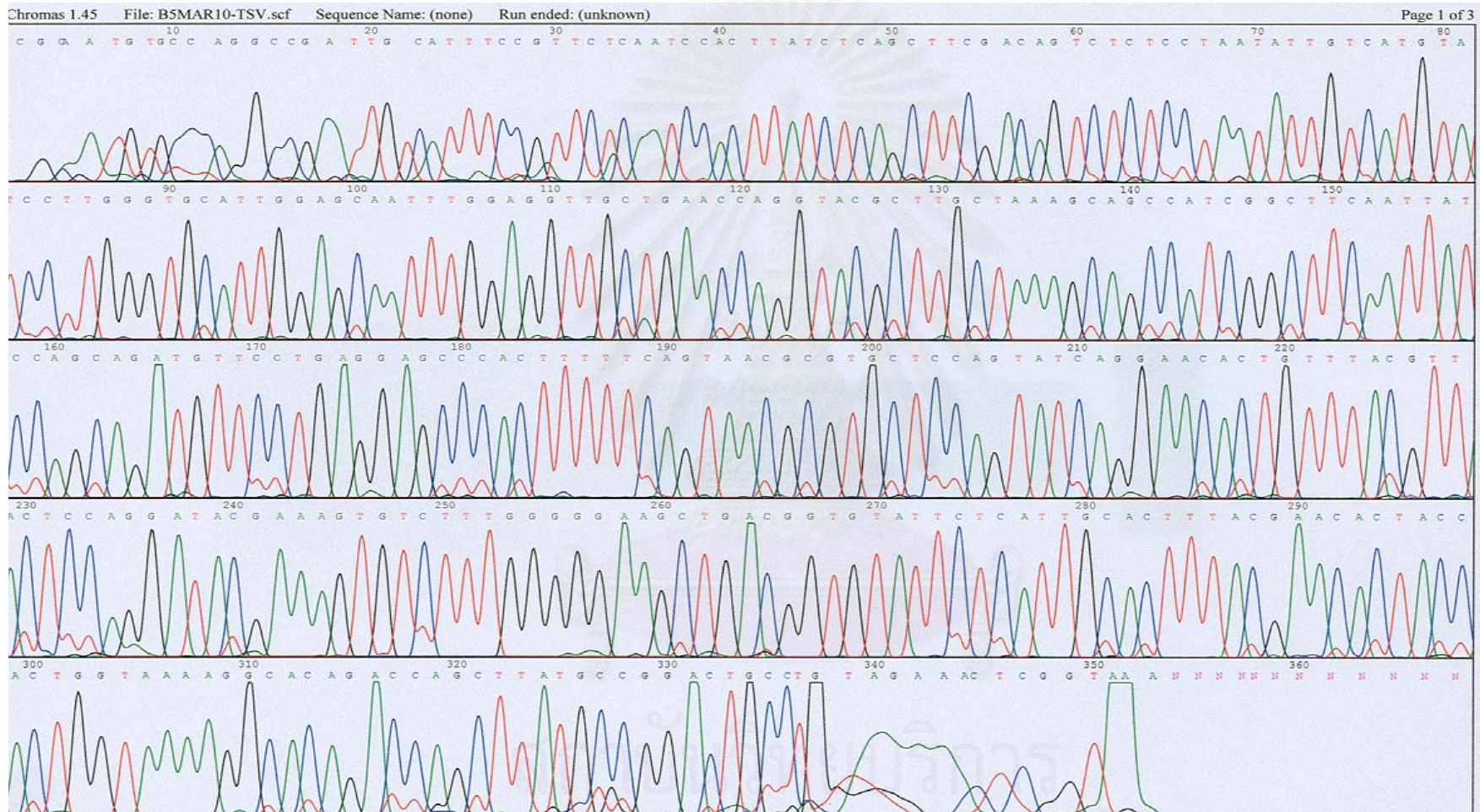
รูปที่ 4 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B6MAR01_TSV)



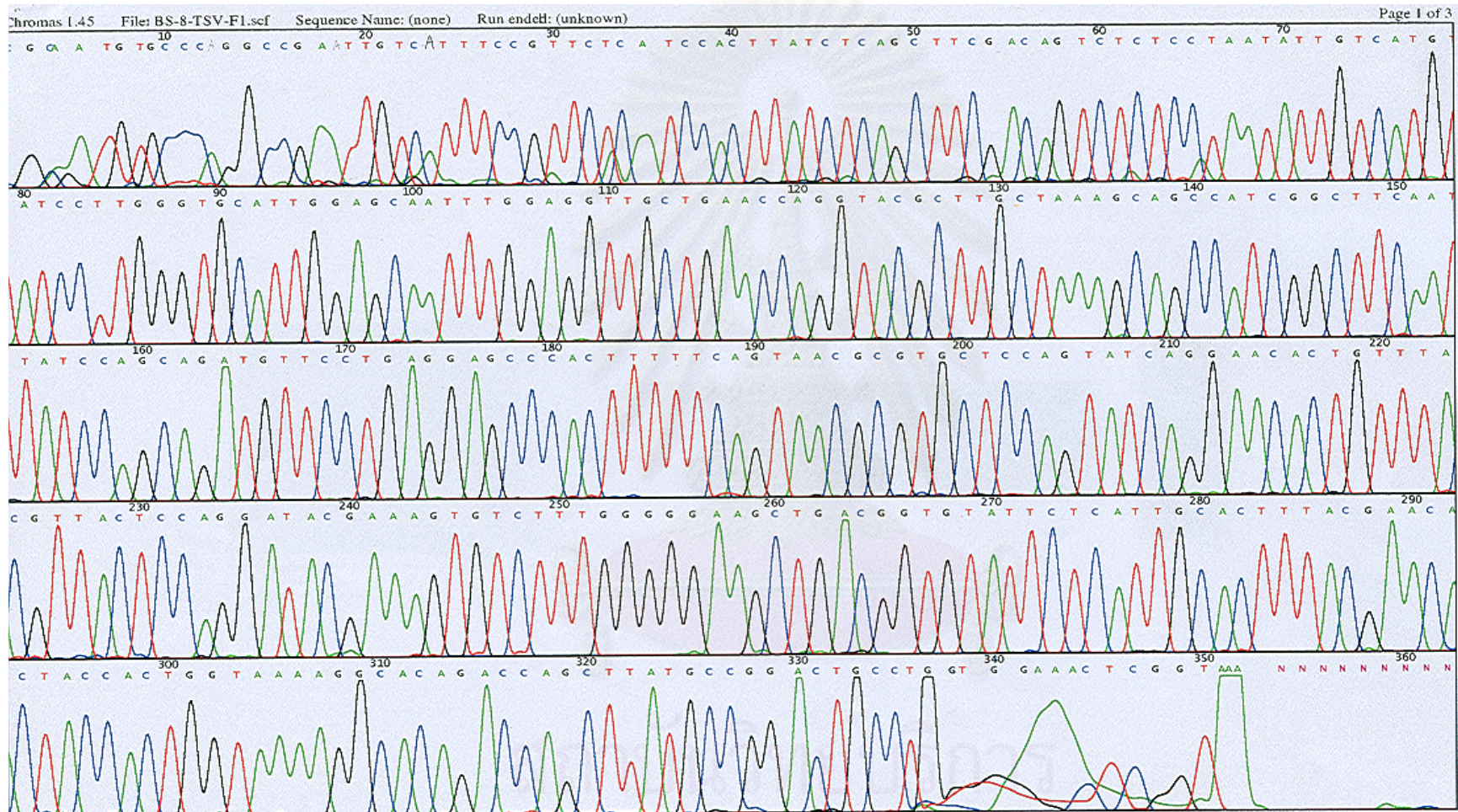
รูปที่ 5 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 1 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B8MAR01_TSV)



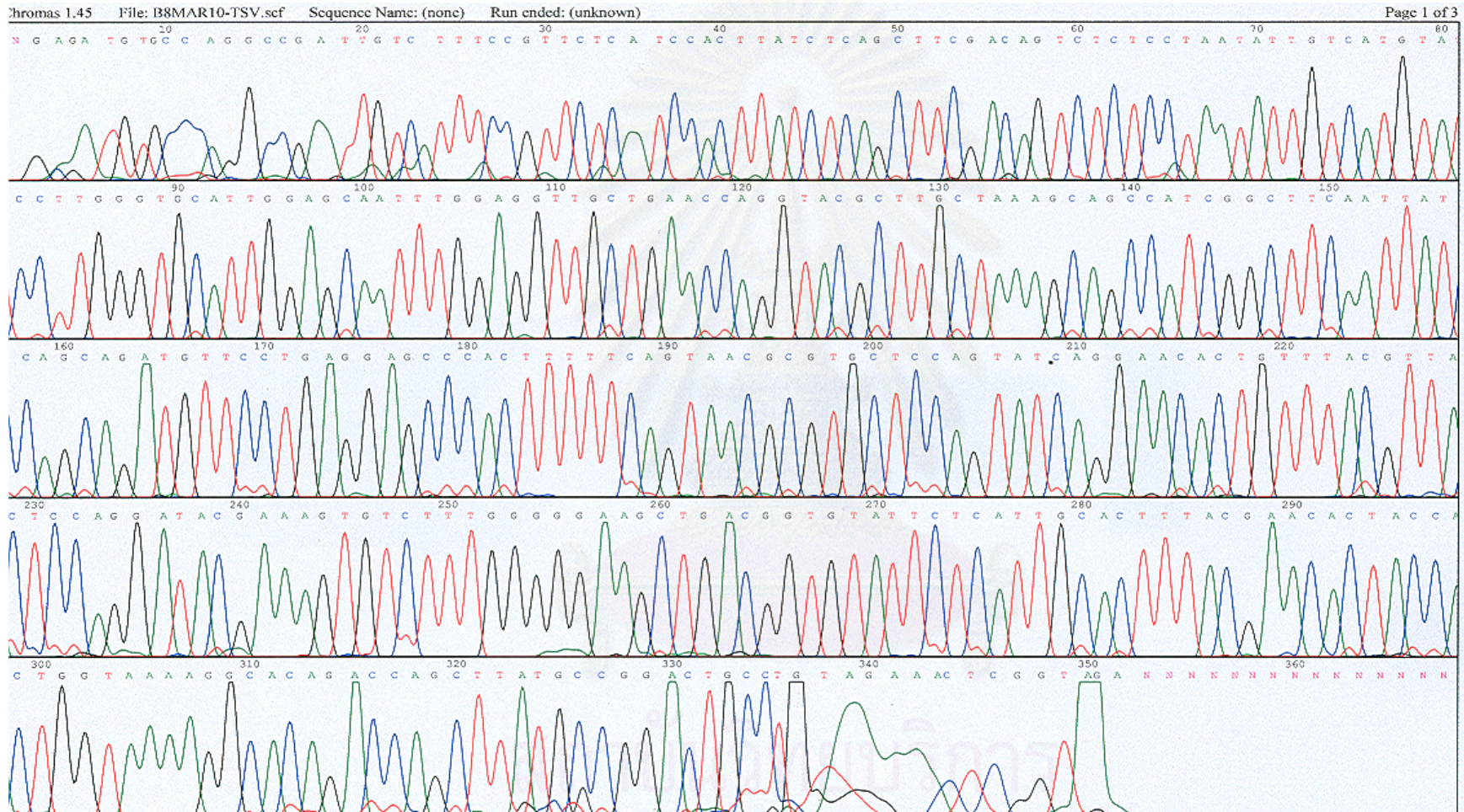
รูปที่ 6 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS4_TSV)



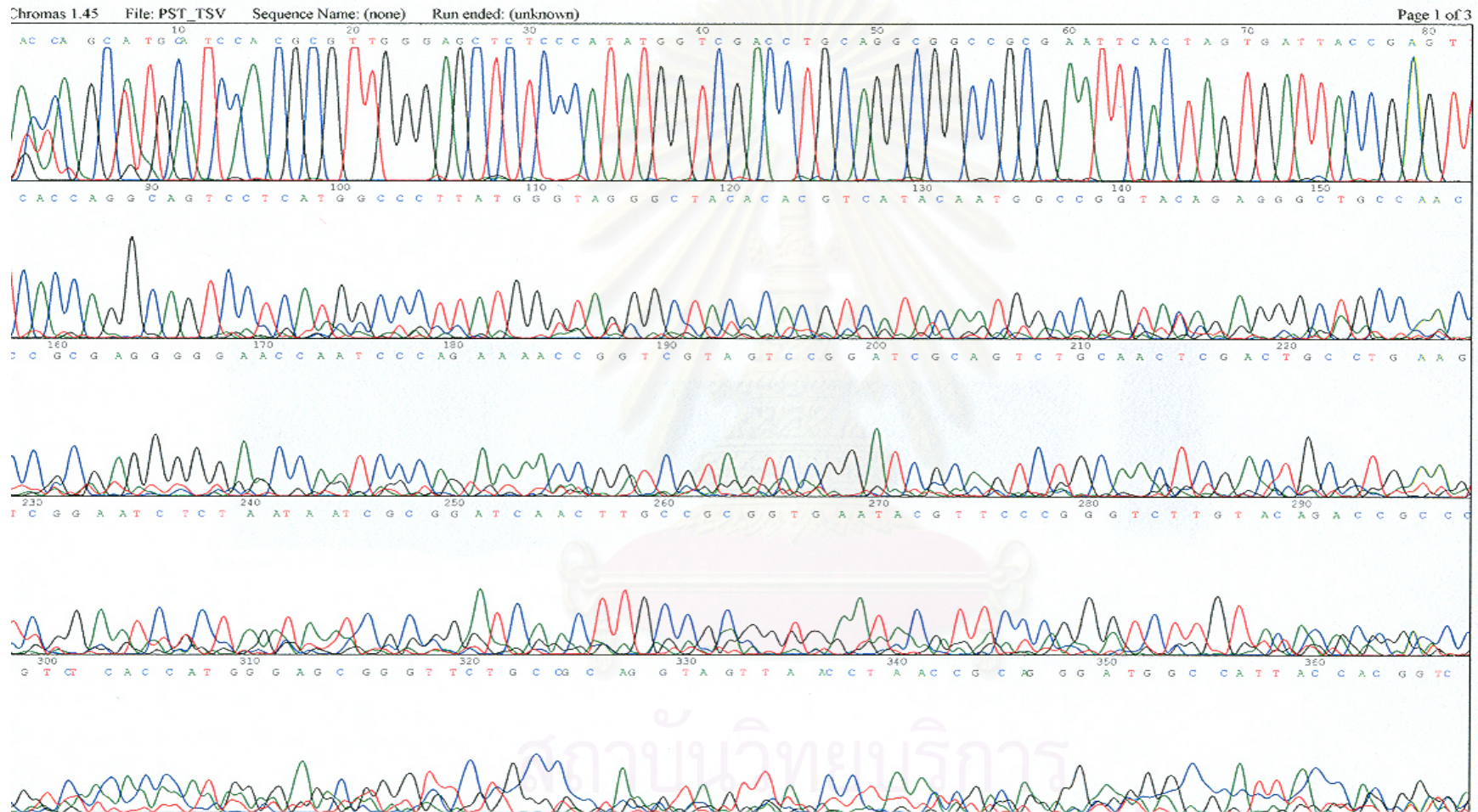
รูปที่ 7 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B5MAR10_TSV)



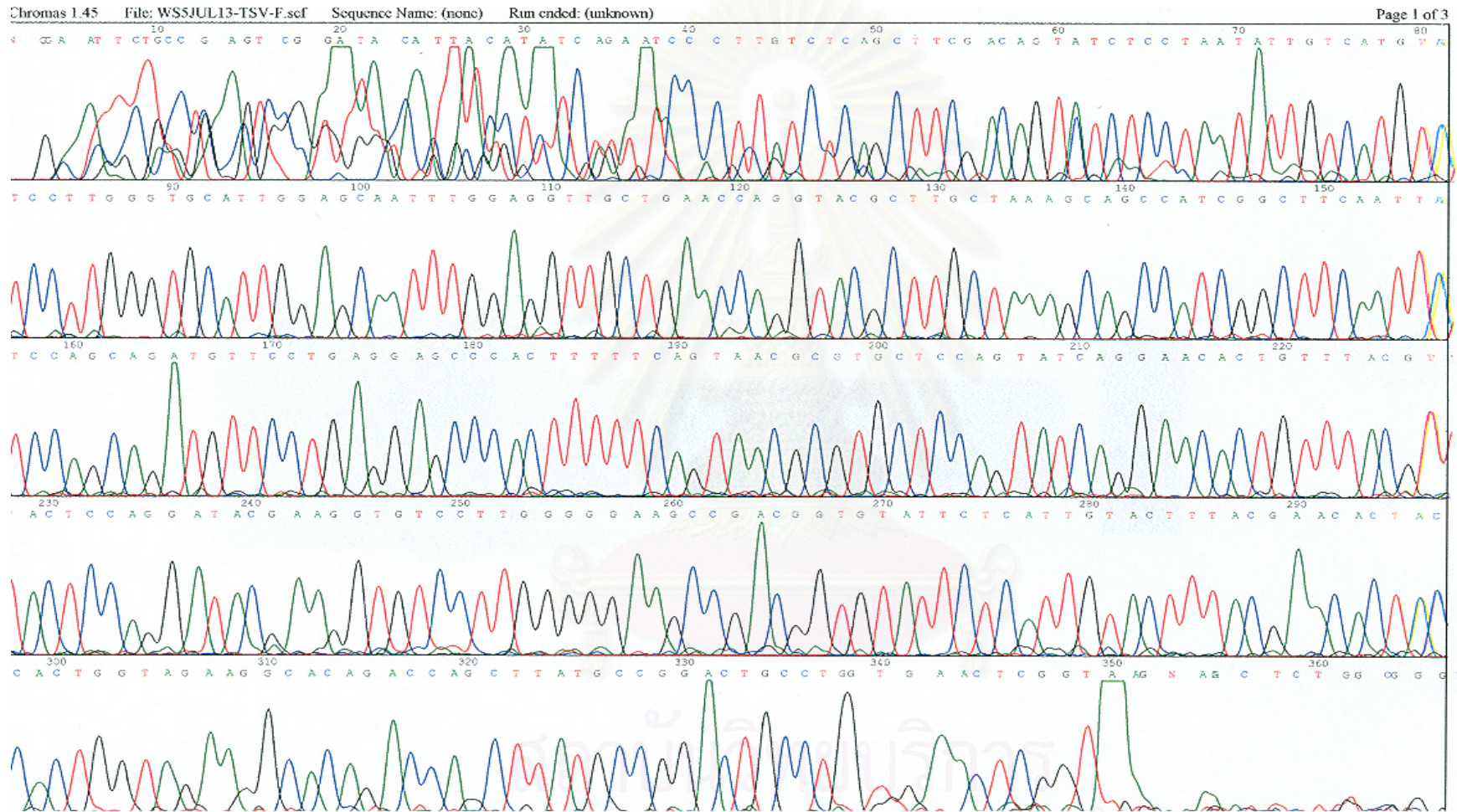
รูปที่ 8 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกึ่งกุลาดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า BS8_TSV)



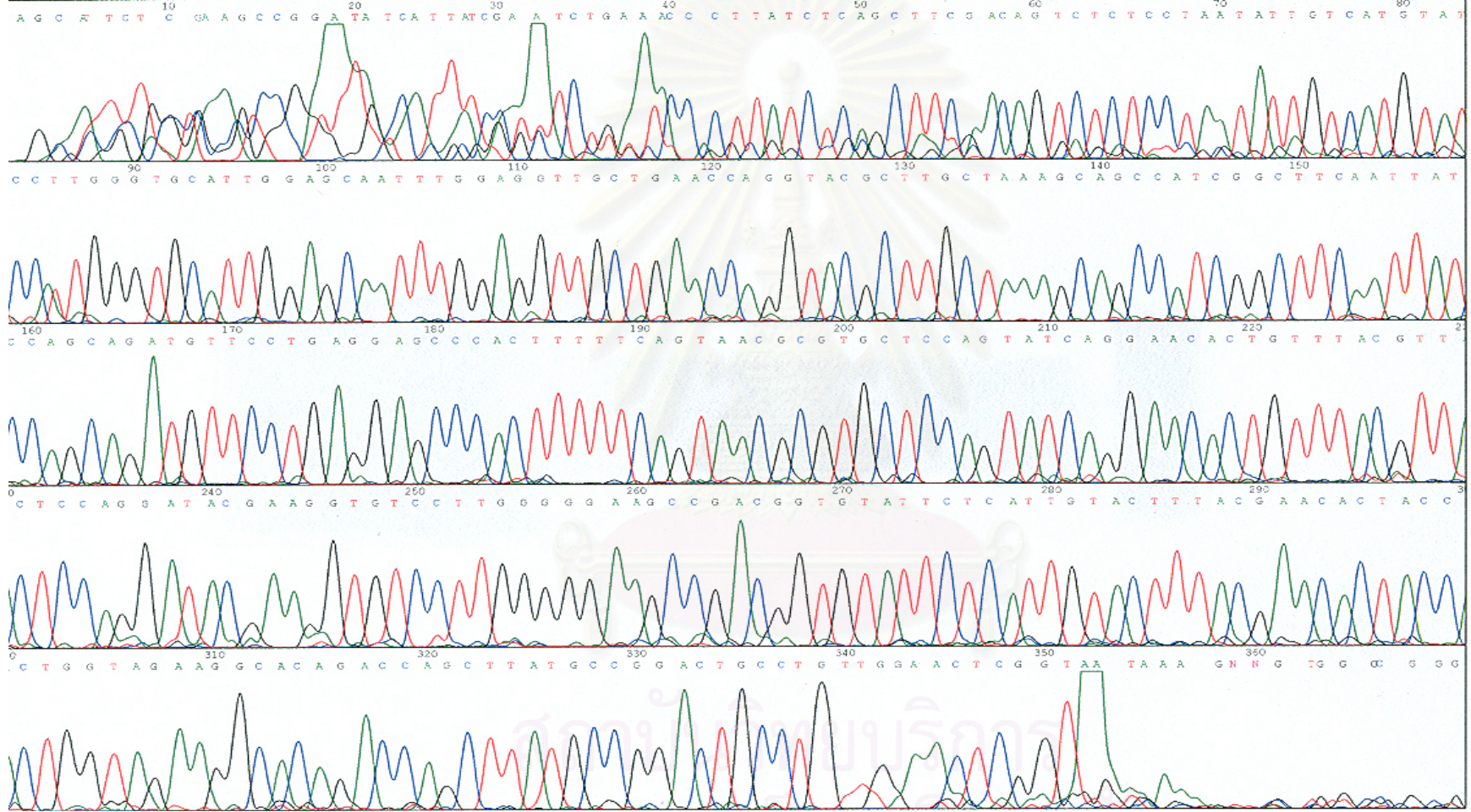
รูปที่ 9 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกิ้งกูดดำ จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 10 เดือนมีนาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า B8MAR10_TSV)



รูปที่ 10 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งกุลาดำ จังหวัดสมุทรสาคร ณ วันที่ 15 เดือนพฤษภาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า PST_TSV)



รูปที่ 11 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 13 เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS5JUL13_TSV)



รูปที่ 12 กราฟแสดงข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากตัวอย่างกุ้งขาว จังหวัดฉะเชิงเทรา ณ วันที่ 13 เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2547 (ให้ชื่อว่า WS8JUL13_TSV)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว สุกัญญา ผลิตกุล เกิดเมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ.2521 ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร จบปริญญาตรีจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2543 ได้รับทุนไปฝึกงานทางด้านสัตวเล็กและสัตว์ใหญ่ที่ประเทศญี่ปุ่นเป็นเวลา 1 เดือน หลังจากจบการศึกษาเข้าทำงานที่โรงพยาบาลสัตว์สุวรรณชาติ (โครงการส่วนพระองค์) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 และเข้าศึกษาต่อปริญญาโทในปีการศึกษา 2545 ที่ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย