บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุ

1.1 กุ้งกุลาดำและเชื้อไวรัส

กุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์ขนาด 200-300 กรัมได้รับอนุเคราะห์จากฟาร์มกรุงเทพเพาะเลี้ยงกุ้งในเครือบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช

กุ้งกุลาดำขนาด 4-6 กรัม นำกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่ออายุ 40-50 วัน ซึ่งมีขนาด 3-4 กรัม มาเลี้ยงต่อในถังไฟเบอร์กลมที่โรงเพาะฟักศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

กุ้งปกติและกุ้งติดเชื้อไวรัส MBV/HPV อายุ 50-60 วัน จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดสตูล ปัตตานี และสงขลา นำมาพักในถังไฟเบอร์กลมที่โรงเพาะฟักศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

เนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำติดเชื้อ WSSV และเชื้อ YHV ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

1.2 อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

อาหารเม็ดยี่ห้อสตาร์ฟีดเบอร์ 3 และ 4 บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด

1.3 ดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้นๆ (Oligonucleotide primers)

WSSV PCR Primer 1 5’-GAC AGA GAT ATG CAC GCC AA-3’

WSSV PCR Primer 2 5’-ACC AGT GTT TCG TCA TGG AG-3’

WSSV nested PCR primer 1 5’-ACC TCT TAA CTC CCT CGA CT-3’

WSSV nested PCR primer 2 5’-TTG TAG AGG GCA TGA GGG AT-3’

YHV 273R primer (cDNA synthesis 5’-CCG ACG AGA GTG TTA GGA GG-3’

YHV 273F primer 5’-CAA GAT CTC ACG GCA ACT CA-3’

ดีเอ็นเอต้นแบบทั้งหมดสั่งสังเคราะห์จากบริษัท Life Technology

1.4 อาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 pH 7.6

ทำการเตรียม 2x M-199 โดยละลาย M-199 (Gibco BRL) ในน้ำ deionized 450 มิลลิลิตร คนให้ละลายและกรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรู 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวด เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเตรียมเป็น K-199 พีเอช 7.6 100 มิลลิลิตร ตามส่วนผสมที่ดัดแปลงจาก Itami และคณะ (1992) ดังรายละเอียด

M-199	50	มิลลิลิตร
Magnesium chloride hexa-hydrous	33	มิลลิกรัม
Magnesium sulfate hepta-hydrous	30	มิลลิกรัม
Sodium hydrogen phosphate	0.5	มิลลิกรัม
Sodium chloride	110	มิลลิกรัม
Calcium chloride dihydrous	9	มิลลิกรัม
HEPES	23.8	มิลลิกรัม
L-glutamine	0.10	มิลลิกรัม

เติมน้ำ deionized จนครบ 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.6 กรองผ่านเมมเบรนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางรูขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใส่ขวดเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

1.5 สารเคมี

1.5.1 สารเคมีสำหรับเตรียมเชื้อไวรัส

สารเคมี	เกรด	บริษัทที่ผลิต
Sodium hydrogen phosphate	วิเคราะห์	Merck
Potassium hydrogen phosphate	**วิเคราะห์**	**Merck**
Potassium chloride	วิเคราะห์	Merck
Sodium chloride	วิเคราะห์	Merck

1.5.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

สารเคมี	เกรด	บริษัทที่ผลิต
Albumin	อณูชีวโมเลกุล	Sigma
Cacodylic acid sodium salt trihydrate	วิเคราะห์	Fluka
Copper sulfate	วิเคราะห์	Merck
Calcium chloride	วิเคราะห์	Merck
Folin Ciocalteus	วิเคราะห์	Merck
Hepes	อณูชีวโมเลกุล	Sigma
M-199 medium	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
L-dihydroxyphenylalanine	อณูชีวโมเลกุล	Sigma
L-cysteine	อณูชีวโมเลกุล	Sigma
Magnesium chloride	อณูชีวโมเลกุล	Sigma
O-toluidine	วิเคราะห์	Merck
Phenol	วิเคราะห์	Merck
Trypan blue	วิเคราะห์	Wako
Trypsin	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
Sodium carbonate	วิเคราะห์	Merck
di-Sodium hydrogen phosphate	วิเคราะห์	Merck
Sodium hydroxide	วิเคราะห์	Merck
Sodium/ Potassium tatrate	วิเคราะห์	Sigma
Sodium chloride	วิเคราะห์	Merck

1.5.3 สารเคมีสำหรับศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

สารเคมี	เกรด	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	วิเคราะห์	Merck
95% ethanol	วิเคราะห์	กรมสรรพสามิตร
Formalin	วิเคราะห์	วิทยาศรม
Glacial acetic acid	วิเคราะห์	Lab Scan

Paraplast plus tissue embedding medium	วิเคราะห์	Oxford Labware
Permount	วิเคราะห์	Eukitt

1.5.4 สารเคมีสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสทางอณูชีวโมเลกุล

สารเคมี	เกรด	บริษัทที่ผลิต
Xylene	วิเคราะห์	Merck
Ammonium acetate	อณูชีวโมเลกุล	Sigma
Boric acid	วิเคราะห์	Merck
Bromphenol blue	วิเคราะห์	Merck
Calcium chloride	วิเคราะห์	Sigma
Ethylenedinitrilo tetraacetic acid - disodium salt dihydrate	วิเคราะห์	Merck
Magnesium chloride	อณูชีวโมเลกุล	Sigma
Glycerol	วิเคราะห์	Merck
Phenol	อณูชีวโมเลกุล	Amresco
Polyethylene glycol	อณูชีวโมเลกุล	Amresco
Sodium dodecyl sulfate	อณูชีวโมเลกุล	Amresco
Sodium hydroxide	อณูชีวโมเลกุล	Amresco
Tris Base	อณูชีวโมเลกุล	Amresco
Tris hydrochloric acid	วิเคราะห์	Merck
Xylene eyanol	วิเคราะห์	Merck
Agarose	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
dATP	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
dCTP	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
dGTP	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
dTTP	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
Ethedium bromide	อณูชีวโมเลกุล	Sigma
Isogen	อณูชีวโมเลกุล	Molecular Research Center, Japan
M-MLV	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL

Proteinase K	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
Rnase A	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL
Taq polymerase	อณูชีวโมเลกุล	Gibco BRL

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งทดลอง

2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลมปริมาตร 3 ลูกบาศก์เมตร

2.1.2 ถังไฟเบอร์กลาสปริมาตร 250 ลิตร

2.1.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

2.1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำประกอบด้วยสายยาง เครื่องปั๊มน้ำชนิดจุ่ม (submersible pump)

2.1.5 อุปกรณ์ขนย้ายกุ้งทดลอง ได้แก่ ถังพลาสติก สวิง

2.1.6 อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง แอมโมเนีย ไนไตรท์ คือขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ หลอดทดลอง ปิเปต ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

2.2 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.2.1 อุปกรณ์เก็บเลือดกุ้งคือเข็มขนาด 20-25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับแยกซีรัมคือเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman, Avanti^{TM} 30 centrifuge)

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด คือฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

2.2.4 อุปกรณ์สำหรับเจือจางเลือดคือ หลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ปิเปตอัตโนมัติ ทิป เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)

2.3 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.3.1 อุปกรณ์สำหรับดองรักษาสภาพเนื้อเยื่อกุ้งคือเข็มขนาด 23 G ยาว 1 นิ้ว กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ขวดพลาสติกทนกรด กรรไกร มีดผ่าตัด

2.3.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมเนื้อเยื่อคือกล่องใส่เนื้อเยื่อ (cassette) เอ็มเบดดิ้งริง เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) (Technicon) ชุดเอ็มเบดดิ้ง (embedding center)

2.3.3 อุปกรณ์สำหรับตัดแต่งเนื้อเยื่อคือใบมีดผ่าตัด

2.3.4 อุปกรณ์สำหรับตัดเนื้อเยื่อคือไมโครโตม (micortome) (Jung AG Heidelberg) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Leica, Disposable Microtome Blades) สไลด์แก้ว อ่างน้ำอุ่น

2.3.5 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ถาวรคือ ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Sunyo, Program Oven) ชุดสำหรับใส่สีย้อม แผ่นปิดสไลด์ ถาดใส่สไลด์

2.3.6 อุปกรณ์สำหรับตรวจผลและบันทึกภาพคือกล้องจุลทรรศน์ และกล้องถ่ายรูป

2.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ผลทางชีวโมเลกุล

2.4.1 อุปกรณ์สำหรับสกัดกรดนิวคลิอิคแอซิดคือเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman, Avanti ^{TM} 30 centrifuge) เครื่องเซ็นตริฟิวจ์ขนาดเล็ก (IWAKI Inc. Ltd, IWAKI Centrifuge Micro 6 HG)

2.4.2 อุปกรณ์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไวรัสคือเครื่องควบคุมอุณหภูมิตั้งโปรแกรมได้ (Thermal cycle, MJ Research, PTC 100)

2.4.3 อุปกรณ์สำหรับแยกดีเอ็นเอคืออิเลคโทรโฟริซิส (electrophoresis) พร้อมชุดควบคุมการจ่ายกระแสไฟ (Scie-Plas, PSU 400/600)

2.4.4 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบแถบดีเอ็นเอคือเครื่อง UV light transilluminator (VL- Vilber Lourmat, TFX-20M)

2.5 อุปกรณ์อื่นๆ

2.5.1อุปกรณ์สำหรับชั่งวัดน้ำหนักคือ เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius Basic, BA310S)เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius, BP3100S)

2.5.2 อุปกรณ์สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงคือ สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-1201)

2.5.3 อุปกรณ์สำหรับจัดเก็บสารละลาย สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ ขวดแก้วทนกรด ทนด่าง ขนาดต่างๆ ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ (-70^{0}C) (Science Temp, USA)

2.5.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมวัสดุ สารเคมี อุปกรณ์ปลอดเชื้อ คือหม้อนึ่งความดัน (Tomy Seiko Co., Ltd, SS-325) ตู้ปลอดเชื้อ Lamina flow (Dwyer Mark II, Clean) ตู้อบฆ่าเชื้อ (Sunyo, Program Oven)

3. วิธีวิเคราะห์

3.1 การนับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count)

ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24 G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตปรับปริมาตรอัตโนมัติดูดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย trypan blue 0.45 มิลลิลิตรให้เข้ากันในหลอดพลาสติกนับเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วคำนวณเป็น เซลล์ต่อมิลลิลิตรจากสูตร

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้างxยาวxสูง

= 1mm x1 mm x 0.1 mm

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm^3)

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ มิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (ดัดแปลงจาก Soderhall *et al*., 1988)

ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24 G ความยาว 12 มิลลิเมตร ดูดสารละลาย L-cysteine 0.2 มิลลิลิตร เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดพลาสติกโดยใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดขึ้นลงเบาๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,590x*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ล้างเซลล์เม็ดเลือดด้วยสารละลาย K-199ปริมาตร 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย CAC buffer 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในไนโตรเจนเหลว

นำเซลล์เม็ดเลือดที่ได้มาทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องอัลตร้าโซนิกส์ ฮอโมจิไนซ์เซอร์ ที่แอมพลิจูด (amplitude) ระดับ 30 เป็นเวลา 20 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,497x*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใส (HLS) มาวิเคราะห์ทันที โดยเติมสารละลาย trypsin 0.2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร เติม HLS 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ 2 นาที จึงเติมสารละลาย CAC buffer 1.8 มิลลิลิตร ตั้งให้เกิดปฏิกิริยา 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงทุก 2

นาที จนกระทั่งค่าลดลง สำหรับหลอดที่เป็นตัวเทียบ (blank)ใช้สาร ละลาย CAC buffer 0.2 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสคำนวณได้จากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส} = \frac{\text{ยูนิต/นาที } (0.001)^{*}}{\text{โปรตีนใน HLS 0.2 มิลลิลิตร}}$$

$$= \text{ยูนิต/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน}$$

* 0.001 เป็นค่าที่กำหนดเอง

ยูนิต (unit) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามีน (dopamine) โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงภายในเวลา 1 นาที

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเซลล์เม็ดเลือดและซีรัม (ดัดแปลงจาก Lowry *et al*., 1951)

เติมสารละลาย HLS ที่ได้จากการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตกในข้อ 2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรที่มีน้ำ deionized 0.36 มิลลิลิตร เติม alkaline copper solution 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งให้เกิดปฏิกิริยานาน 10 นาที แล้วเติมสารละลาย folin reagent 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งให้เกิดปฏิกิริยานาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตัวเทียบใช้น้ำ deionized 0.4 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA)

สำหรับซีรัมเตรียมโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24 G ความยาว 12 มิลลิเมตรที่ไม่บรรจุสารป้องกันเลือดแข็งตัวเจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ 0.2-0.3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง บดเลือดที่แข็งตัวด้วยแท่งบดพลาสติก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,497x*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แยกส่วนใสสำหรับวิเคราะห์โปรตีน โดยเติมซีรัม 5 ไมโครลิตร ลงในน้ำ deionized 395 ไมโครลิตร แล้วเติมสารต่างๆ สำหรับทำปฏิกิริยา วัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA เช่นเดียวกับการวิเคราะห์โปรตีนใน HLS

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด (Blood glucose) (ดัดแปลงจาก Wedemeyer, *et al*.,

1977)

ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24 G ความยาว 12 มิลลิเมตร ที่ไม่บรรจุสาร*ป้องกัน*เลือดแข็งตัว เจาะเลือดกุ้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร ถ่ายในหลอดพลาสติกและทำการวิเคราะห์ทันที โดยเติมเลือด 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกที่มีสารละลาย TCA 3 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,590x*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แยกส่วนใส 0.5 มิลลิลิตรเติมในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี color reagent 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ในน้ำเดือด 8 นาที ตั้งไว้ให้เย็นและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ตัวเทียบใช้สารละลาย Trichloro acetic acid (TCA) 3 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างแล้วคำนวณปริมาณกลูโคสในเลือดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.5 วิเคราะห์ปริมาณทองแดงในซีรัมกุ้ง (AOAC, 1985)

ใช้ปิเปตปรับปริมาตรอัตโนมัติดูดซีรัมที่แยกโดยวิธีการเดียวกับข้อ 3.3 0.1 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตรที่มีสารละลาย nitric acid 65 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดการย่อยโดยสมบูรณ์นาน 2 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำ deionized ให้ครบ 5 มิลลิลิตร นำสารละลายไปหมุนเหวี่ยงแยกโปรตีนที่ 1600x*g* อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ถ่ายส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วนำไปวัดปริมาณทองแดงด้วยเครื่อง atomic absorption spectropho-tometer (Beckman) ที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร คำนวณปริมาณทองแดงโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานทองแดง

3.6 การตรวจเชื้อไวรัสโดยวิธีชีวโมเลกุล

3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งตามวิธีการดัดแปลงจาก Sambrook และ Russel (2001) (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก ข ที่ 1)

3.6.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างกุ้งโดยใช้สารละลาย Isoen (Molecular Research Center Inc., Japan) (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก ข ที่ 2)

3.6.3 การตรวจหาเชื้อ WSSV โดยวิธี PCR ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Takahashi และคณะ (1996) (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก ข ที่ 3)

3.6.4 การตรวจหาเชื้อ YHV โดยวิธี RT-PCR ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Tang และ Lightner (1999) (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก ข ที่ 4)

3.7 การตรวจสอบเชื้อ MBV/HPV ในตับโดยวิธี squash (Brock and Main, 1994)

ใช้ปากคีบดึงส่วนตับของกุ้ง และนำไปกดให้แบนบนสไลด์สะอาด ตั้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำสไลด์ตรึงตัวอย่างในเมธิลแอลกอฮอล์ 1-2 นาที ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกไซลินและ อีโอซินวางให้แห้ง แล้วตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.8 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

3.8.1 การเก็บตัวอย่าง (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก ข ที่ 5.1)

3.8.2 การขจัดน้ำและนำพาราฟินเข้าตัวอย่างเนื้อเยื่อ (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก ข ที่ 5.2)

3.8.3 การฝังตัวอย่างในพาราฟิน (embed) และตัดตัวอย่าง (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก ข ที่ 5.3)

3.8.4 การย้อมสี และ mount slide (รายละเอียดวิธีการแสดงในภาคผนวก ข ที่ 5.4)

4. วิธีการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อ เพิ่มปริมาณเชื้อ ทดสอบการก่อโรค และความรุนแรงของเชื้อไวรัส

4.1.1 การเตรียมเชื้อไวรัสเริ่มต้น

แยกเชื้อ WSSV จากกุ้งที่ป่วยแสดงอาการของโรคชัดเจนและได้ตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Takahashi และคณะ (1996) รวมทั้งตรวจสอบว่ากุ้งที่ติดเชื้อดังกล่าวไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ YHV ด้วยการใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse transcription and Polymerase chain reaction) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Tang และ Lightner (1999) แล้วนำกุ้งที่ติดเชื้อมาแยกเหงือก หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง บดให้ละเอียดในอาหารเลี้ยงเซลล์ K-199 พีเอช 7.6 (Itami *et al.,* 1992) ในอัตราเนื้อเยื่อ 1 ส่วน และ K-199 10 ส่วน นำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000x*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกส่วนใสกรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรู 0.45 ไมโครเมตร แบ่งสารละลายใส่หลอดไครโอ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และจัดเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

ส่วนเชื้อ YHV ทำการแยกจากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส และผ่านการตรวจยืนยันว่าเป็นเชื้อชนิดที่ต้องการด้วยวิธี RT-PCR โดยไม่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสอื่น นำเนื้อเยื่อกุ้งมาบด แยกเชื้อ และจัดเก็บด้วยวิธีการเดียวกัน

4.1.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสสำหรับชุดทดลอง

ใช้พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำขนาด 200-300 กรัม ลำเลียงจากจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยใส่ถุงพลาสติกอย่างหนาใส่น้ำทะเล และอัดแก๊สออกซิเจน ขนส่งสู่ห้องปฏิบัติการ (ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) และเลี้ยงกุ้งทดลองในถังไฟเบอร์ขนาด 1 ตัน ที่เติมน้ำทะเลความเค็ม 30 ส่วนในพัน ปริมาตร 250 ลิตร และต่อสายยางเติมออกซิเจนตลอดเวลา เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ด เพื่อหลีกการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสอื่นๆ เป็นเวลา 7-10 วัน ดูดเลือดกุ้งประมาณ 0.2 มิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบว่าไม่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสก่อนทำการทดลอง

เพิ่มปริมาณเชื้อ WSSV โดยนำสารละลายเชื้อที่เตรียมและจัดเก็บไว้ที่ –70 องศาเซลเซียส ในข้อ 4.1.1 มาวางให้ละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เจือจางเชื้อ 1000 เท่าด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำบริเวณปล้องที่ 6 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ต่อกุ้ง 1 ตัว จำนวน 4 ตัว เลี้ยงกุ้งในถังทึบแสง หลังจากฉีดเชื้อเป็นเวลา 3-5 วัน เก็บเลือดกุ้งทั้งหมด โดยใช้กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 20 มิลลิลิตร หัวเข็มเบอร์ 20 G ยาว 1 นิ้ว ดูดเลือดบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 1 ส่วนและเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 4 ส่วน รวมเลือดจากกุ้งทุกตัวผสมให้เข้ากันดีแล้วแบ่งใส่หลอดไครโอ หลอดละ 1 มิลลิลิตร จัดเก็บในตู้แช่ที่ –70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป ตัวอย่างเลือดที่เจือจางแล้วนำมาตรวจยืนยันการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวว่าไม่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสอื่น

การเพิ่มปริมาณเชื้อ YHV ทำโดยนำสารละลายเชื้อหัวเหลืองที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1.1 มาเจือจางแล้วฉีดกุ้งทดลอง 4 ตัว เมื่อกุ้งแสดงอาการของโรคชัดเจน ดูดเลือด เจือจางและจัดเก็บด้วยวิธีการเดียวกัน ตรวจสอบการติดเชื้อ YHV และยืนยันไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ WSSV ด้วยวิธี RT-PCR และ PCR ตามลำดับ

กุ้งทดลองที่นำมาจากแหล่งเดียวกัน นำมาฉีดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 2 ตัว เลี้ยงเป็นชุดควบคุม ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อต่างๆ หลังเลี้ยงนาน 10 วัน

4.1.3 การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อไวรัส

เตรียมกุ้งทดลองโดยนำกุ้งกุลาดำอายุ 40-50 วัน (ขนาด 3-4 กรัม) ที่ปลอดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ที่บรรจุน้ำทะเล 5 ตัน เตรียมสีและคุณภาพน้ำโดยเติมปูนโดโลไมท์เพื่อปรับค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ให้มีค่า 80-120 ส่วนในล้าน และพีเอช ช่วง 7.5-8.5 เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารเม็ดจนได้น้ำหนัก 4-5 กรัม

ทดสอบการเกิดโรคของเชื้อ WSSV โดยนำสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1.2 มา 1 หลอดวางให้ละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเหวี่ยงแยกเม็ดเลือดด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 1600x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสมาเจือจางด้วยสาร

ละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4 ให้ได้เป็น $10^{-1} – 10^{-10}$ เก็บเชื้อที่เจือจางแล้วในน้ำแข็ง นำสารละลายเจือจาง $10^{-3} –10^{-10}$ ฉีดเข้ากุ้งกุลาดำตัวละ 20 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 20 ตัว ชุดควบคุมฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.6 ในปริมาตรเท่ากัน เลี้ยงกุ้งทดลองในถังไฟเบอร์ ขนาด 250 ลิตร ให้อาหารเม็ด เปลี่ยนถ่ายน้ำ ทำความสะอาดตู้ บันทึกจำนวนกุ้งที่ตายตรวจยืนยันสาเหตุการตายด้วยวิธี PCR เป็นเวลา 15 วัน นำค่าที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองมาคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีของ Reed และ Meunch (1938) จากสูตร

LD_{50} = lny concentration below 50% mortality + (50 – mortality below 50%/ mortality above 50% - mortality below 50%) (lny concentration above 50% mortality - lny concentration below 50% mortality)

ทดสอบการเกิดโรคของเชื้อ YHVโดยนำสารละลายเชื้อที่เตรียมในข้อ 4.1.2 (YHV) เจือจาง 10^{-1}-10^{15} และนำหลอดที่เจือจาง 10^{-6}-10^{-15} ฉีดกุ้งทดลอง เลี้ยง บันทึกการตาย และคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อด้วยวิธีการเดียวกัน ส่วนกุ้งที่ตายนำมาตรวจยืนยันสาเหตุของการตายด้วยวิธี RT-PCR

4.2 การเหนี่ยวนำให้กุ้งกุลาดำเกิดการติดเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการและ การตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัวกุ้ง

4.2.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ WSSV

เตรียมสารละลายเชื้อที่เก็บไว้จากข้อ 4.1.2 มาวางให้ละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเหวี่ยงแยกเม็ดเลือดด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 1,600x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสมาเจือจางให้ได้ 200 เท่า (ชุดการทดลองที่ 1) 1,000 เท่า (ชุดการทดลองที่ 2) และ 10,000 เท่า (ชุดการทดลองที่ 3) ของค่า LD_{50} ที่คำนวณได้ ในข้อ 4.1.3 ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4 เก็บเชื้อที่เจือจางแล้วในน้ำแข็ง นำมาฉีดเข้ากุ้งกุลาดำที่ปลอดเชื้อไวรัสจำนวน 500 ตัว (ชุดการทดลองที่ 1) และ 1,000 ตัว (ชุดการทดลองที่ 2 และ 3) ตัวละ 20 ไมโครลิตร ชุดควบคุมในแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 500 ตัว ฉีดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ พีเอช 7.4 ตัวละ 20 ไมโครลิตร เลี้ยงกุ้งทดลองชุดที่ 1 และ 2 ในถังไฟเบอร์กลมขนาดบรรจุ 3 ตัน ที่เติมน้ำทะเล 2.8 ตัน ถังละ 250 ตัว ให้อาหารเม็ด ทำความสะอาดตู้ ดูดตะกอน หมุนเวียนน้ำผ่านระบบกรองที่มีแผ่นกรอง เปลือกหอย ทราย หินและถ่าน เก็บตัวอย่างกุ้งที่ตายออกจากถังเลี้ยงวันละ 4 ครั้ง ระยะเวลาห่างกันครั้งละ 5-6 ชั่วโมง สำหรับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงในระบบเดียวกันแต่ทำการเปลี่ยนถ่าย

น้ำประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ทุก 3 วัน และทำการเก็บกุ้งตายและใกล้ตายออกจากระบบการเลี้ยงวันละ 4-5 ครั้ง เพื่อหลีกเลี่ยงการติดเชื้อซ้ำจากกรณีกุ้งปกติกินกุ้งที่ตายหรือใกล้ตาย ทำการตรวจยืนยันสาเหตุการตายของกุ้งทุกชุดด้วยวิธี PCR

4.2.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ YHV

เตรียมสารละลายเชื้อที่เก็บไว้จากข้อ 3.1.2 มาเตรียมและฉีดเข้ากุ้งทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 4.2.1 แต่ใช้เชื้อเจือจาง 100,000 เท่าของค่า LD_{50} ที่คำนวณได้ ในข้อ 4.1.3 เลี้ยงกุ้งทดลองโดยใช้ระบบการเลี้ยงเดียวกับชุดการทดลองที่ 3 ในข้อ 4.2.1 และตรวจยืนยันสาเหตุการตายของกุ้งด้วยวิธี RT-PCR

4.2.3 การตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัวกุ้ง

ทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ไม่แสดงอาการของโรคหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV และ YHV (ในข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ตามลำดับ) ทุก 5-7 วัน ครั้งละ 6-10 ตัว นำมาตรวจ สอบการคงอยู่ของเชื้อ WSSV ในตัวกุ้งโดยวิธี PCR และตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ YHV ด้วยวิธี RT-PCR ส่วนชุดการทดลองที่ฉีดเชื้อ YHV ก็ทำการสุ่มทุก 5-7 วัน ครั้งละ 6-10 ตัว เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตัวกุ้งโดยวิธี RT-PCR และตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ WSSV ด้วยวิธี PCR

4.3 การเตรียมกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ MBV/HPV

นำกุ้งกุลาดำจากฟาร์มที่มีและไม่มีประวัติการระบาดของโรค YHV และ WSSV โดยคัด เลือกเฉพาะกุ้งตัวที่มีขนาดเล็กซึ่งมีน้ำหนักตัว 1-2 กรัม (กุ้งปกติอายุประมาณ 40-50 วัน น้ำหนัก 3-5 กรัม) และตรวจพบเบื้องต้นว่าติดเชื้อ MBV/HPVในตับและตับอ่อน โดยการบดตับกุ้งบนสไลด์แก้ว (squash technique) และย้อมสีตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Brock และ Main (1994) และตรวจหาก้อนโปรตีน (MBV) หรือก้อนไวรัส (HPV) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคัดกุ้งที่เจริญเติบโตปกติจากบ่อเดียวกันเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ตรวจสอบว่ากุ้งทดลองทั้งสองกลุ่มว่าไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ YHVและ WSSV ก่อนนำมาทดลอง

4.4 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรค ไวรัส ของกุ้งกุลาดำที่รอดตายจากการติดเชื้อ

4.4.1 ทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของกุ้งรอดตายที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV

กุ้งกุลาดำรอดตายจากการทดลองในข้อ 3.2.1 หลังจากการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อนาน 25 และ 45 วัน (ชุดการทดลองที่ 2) และหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อเป็นระยะเวลา 29 43 และ 57 วัน (ชุดการทดลองที่ 3) และกุ้งชุดควบคุมจากแต่ละกลุ่ม นำมาฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ที่มีความเจือจางเท่ากับค่า LD_{50} ตัวละ 20 ไมโครลิตร เพื่อทดสอบความต้านทานโรค ชุดควบคุมฉีดสาร ละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ตัวละ 20 ไมโครลิตร เลี้ยงกุ้งทุกชุดการทดลองในถังไฟเบอร์ที่เติมน้ำ 200 ลิตรตู้ละ 10 ตัว ให้อาหารเม็ด ทำความสะอาดตู้ ดูดตะกอน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ตรวจนับจำนวนกุ้งที่ตายทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตรารอดตาย ค่าประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรค (RPS) ตามสูตร

$$RPS = (1 - \frac{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งชุดทดลอง}}{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของกุ้งชุดควบคุม}}) \times 100$$

ตารางที่ 4 ชุดการทดลองสำหรับทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของกุ้งรอดตายที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ WSSV

Table 4 Experimental trial for challenge test of surviving shrimp induced by WSSV.

Sample source	**Injection Type**
Experiment 2	
Survivors and control from day 25	WSSV
	YHV
Survivors and control from day 45	WSSV
	YHV
	PBS
Experiment 3	
Survivors and control from day 29 43 and 57	WSSV
	YHV
	PBS

4.4.2 ทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อไวรัสของกุ้งรอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ YHV

ใช้กุ้งกุลาดำที่รอดตายจากการทดลองติดเชื้อ YHV และกุ้งกลุ่มควบคุมที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2 หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อนาน 26 32 46 60 และ 73 วัน มาฉีดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดและฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ในชุดควบคุม (รายละเอียดชุดการทดลองแสดงในตารางที่ 5) เลี้ยงกุ้ง วิเคราะห์และคำนวณผลเช่นเดียว กับการทดลองในข้อ 3.4.1

ตารางที่ 5 ชุดการทดลองสำหรับทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของกุ้งรอดตายที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV

Table 5 Experimental trial for challenge test of surviving shrimp induced by YHV.

Sample source	Injection Type
Survivors and control from day 26	WSSV
	YHV
	PBS
Survivors and control from day 32 46 60 and 73	WSSV
	YHV
	PBS

4.4.3 ทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ MBV/HPV

ใช้กุ้งที่ติดเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 มาฉีดเชื้อ WSSV และ YHV ที่เจือจางเท่ากับค่า LD_{50} ตัวละ 10 ไมโครลิตร ชุดควบคุมฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ตัวละ 10 ไมโครลิตร กุ้งปกติจากบ่อเดียวกันฉีดเชื้อไวรัส และฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เป็นชุดควบคุมตัวละ 20 ไมโครลิตร (รายละเอียดชุดการทดลองแสดงในตารางที่ 6) เลี้ยงกุ้งทดลองในถังไฟเบอร์ที่เติมน้ำ 200 ลิตร ให้อาหารเม็ด ทำความสะอาดตู้ ดูดตะกอน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ตรวจนับจำนวนกุ้งที่ตายทุกวันเป็นเวลา 15 วัน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาอัตรารอดตาย ค่าประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรค

ตารางที่ 6 ชุดการทดลองสำหรับทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อไวรัสของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ MBV/HPV

Table 6 Experimental trial for challenge test of *Penaeus monodon* with MBV/HPV infections.

Area	Sample	Injection Type
Songkhla	Infected shrimp	WSSV
		PBS
	Normal shrimp	WSSV
		PBS
Pattani and Satun	Infected shrimp	WSSV
		YHV
		PBS
	Normal shrimp	WSSV
		YHV
		PBS

4.5 การทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดกุ้งรอดตายต่อเชื้อไวรัส (Neutralization Test)

นำเลือดกุ้งกุลาดำหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ WSSV นาน 45 (ชุดการทดลองที่ 2) และจากกุ้งรอดตาย 43 วัน (ชุดการทดลองที่ 3) และน้ำเลือดกุ้งรอดตายหลังการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV นาน 46 วัน ซึ่งเป็นน้ำเลือดชุดที่กุ้งมีอัตรารอดตายหลังการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อไวรัสสูงสุดมาเหวี่ยงแยกเม็ดเลือดด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 1,600x*g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใส 900 ไมโครลิตรมาผสมกับสารละลายเชื้อไวรัสแต่ละชนิดที่เตรียมเข้มข้นกว่าค่า LD_{50} 100 เท่า 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง และนำ

สารละลายเชื้อมาเจือจางลงอีก 10 เท่า ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ นำไปฉีดกุ้งกุลาดำปกติขนาด 4 กรัม ตัวละ 20 ไมโครลิตร (รายละเอียดชุดทดลองดังตารางที่ 7) เลี้ยงกุ้งทดลองในถังไฟเบอร์ที่เติมน้ำ 200 ลิตร ถังละ 10 ตัว ให้อาหารเม็ด ทำความสะอาดตู้ ดูดตะกอน เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ตรวจนับจำนวนกุ้งที่ตายทุกวันเป็นเวลา 15 วัน คำนวณอัตรารอดตาย ค่าประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรคในแต่ละชุด

ตารางที่ 7 ชุดการทดลองสำหรับทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์เชื้อไวรัสของน้ำเลือดกุ้งกุลาดำ

Table 7 Experimental trial for neutralizing activity test of *Penaeus monodon* serum.

Source of serum	**Incubation Type**
1. Serum from day 45 of WSSV injection (Experiment 2)	PBS, WSSV
2. Serum from day 43 of WSSV injection (Experiment 3)	WSSV, YHV, PBS
3. Serum from day 46 of YHV injection	WSSV, YHV, PBS
4. Normal serum	WSSV, YHV, PBS

4.6 การศึกษาผลของระยะเวลาต่อความสามารถต้านทานโรคไวรัสของกุ้งรอดตายที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

กุ้งรอดตายจากการทดลองในข้อ 3.4.1 ที่ 29 43 และ 57 วัน และกุ้งรอดตายจากการทดลองในข้อ 3.4.2 ที่ระยะเวลา 26 32 46 60 และ 73 วัน หลังการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อโรคติดเชื้อ WSSV และ YHV นำมาทำการเปรียบเทียบอัตรารอดตาย ประสิทธิภาพการต้านทานต่อโรคไวรัสทั้ง 2 ชนิด กับกุ้งปกติในชุดควบคุมในแต่ละช่วงเวลาเพื่อศึกษาระยะเวลาที่กุ้งสามารถต้านทานต่อเชื้อไวรัสที่ทำการเหนี่ยวนำให้ติดซ้ำได้สูงสุด

4.7 การศึกษาองค์ประกอบเลือดกุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งกุลาดำที่รอดตายจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ WSSV นาน 18 วัน (ชุดการทดลองที่ 1) 25 และ 45 วัน (ชุดการทดลองที่ 2) 29 43 และ 57 วัน (ชุดการทดลองที่ 3) ชุดการทดลองที่เหนี่ยวนำให้ติดเชื้อ YHV นาน 32 46 และ 60 วัน กุ้งปกติในชุดควบคุมของแต่ละชุดการทดลองที่ระยะเวลาเดียวกันมานับจำนวนเม็ดเลือดรวม ตามวิธีการของกิจการศุภมาตย์ และสิทธิ บุณยรัตผลิน (2538) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Soderhall และคณะ (1988) ปริมาณโปรตีนในซีรัมตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) ปริมาณกลูโคสในเลือดตามวิธีการของ Hyvarinen และ Nikkila (1962) วัดปริมาณทองแดงในซีรัมด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer

กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ MBV/HPV จะไม่ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดเนื่องจากกุ้งทดลองมีขนาดเล็กมากไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดให้เพียงพอได้

4.8 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำรอดตายในแต่ละชุดการทดลอง กุ้งที่ฉีดสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ในชุดควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกับการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด และกุ้งกุลาดำติดเชื้อ MBV/HPV นำมาเก็บรักษาสภาพโดยใช้น้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson's fixative) (Bell and Lightner, 1988) และผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อเตรียมเป็นสไลด์ถาวรโดยย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน (H&E) (Humason, 1979) ตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ WSSV และ YHV ในห้องปฏิบัติการ และหลังการติดเชื้อ MBV/HPV ในสภาพการเลี้ยงจริง