อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ป่วยเป็นโรคของฟาร์มเลี้ยงกุ้งต่างๆ ในเขตภาคใต้ตอนล่างจากจังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสงขลา จังหวัดปัตตานี จังหวัดสตูล และจังหวัดพัทลุงในพื้นที่จังหวัดละ2 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตับอ่อน (hepatopancreas) หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) แล้วนำไปเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Agar(TCBS) ที่ผสมเกลือแกง 1.5 เปอร์เซนต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงจากนั้นนำเชื้อจากกลุ่ม (colony) เดี่ยวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS มาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยง Tryptic Soy Agar (TSA) ที่ผสมเกลือแกง 1.5 เปอร์เซนต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตการเรืองแสงของเชื้อในที่มืด แล้วทำการแยกเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยง TSA จนได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และลักษณะทางสรีรวิทยา และศึกษาการเกิด haemolysis โดยนำเชื้อที่บริสุทธิ์เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Agar (BA)

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ

นำเชื้อที่แยกได้บริสุทธิ์มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (MacFaddin.1980) โดยทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase tast) เอนไซม์คะตะเลส (catalase test) ทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ อะราบิโนส กลูโคส มอลโตส แมนนิทอล ซูโครส อินโนซิทอล ซอร์บิทอล เมลิบิโอส แรมโนส ฟรุคโตส แลคโตส แมนโนส L-อาร์จินิน L-ออร์นิทีน ทดสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ คืออะไมเลส เจลลาติเนส ยูริเอส อาร์จินีนไดไฮโดรเลส (areginine dihydrolase) ดีคาร์บอกซีเลส 2 ชนิดคือ ไลซีน (lysien) และออร์นิทีน (ornitine) ทริปโธแฟนดีซามิเนส (Tryptophane desaminase) การสร้างอินโดล (indole) การสร้างกรด (Metyl red test) การสร้างอะซิโตอิน (acetoin) การใช้ซิเตรต (Citrate utilization) การเจริญที่อุณหภูมิ 0 4 20 37 40 และ 50 องศาเซลเซียส และ การเจริญใน NaCl ที่ระดับ 0 2 6 8 10 และ 12 เปอร์เซนต์ จากนั้นแยกชนิดของเชื้อตามขั้นตอนของ Baumann และ คณะ (1984): Alsina และ Blanch (1994)

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี Disc Diffusion Method (MacFaddin. 1980)

นำเชื้อ *V. harveyi* ที่แยกได้บริสุทธิ์จากแหล่งต่างๆ ที่เจริญบนอาหาร TSA ผสมเกลือแกง 1.5 เปอร์เซนต์ ละลายในน้ำเกลือเข้มข้น 1.5 เปอร์เซนต์ ที่ปราศจากเชื้อให้ได้ความทึบแสงเท่ากับสารละลาย McFarland มาตรฐาน เบอร์ 0.5 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มในสารละลายเชื้อแล้วนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Agar ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ นำ disc ยาชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบวางลงบนอาหาร Muller Hinton Agar ที่เกลี่ยด้วยสารละลายเชื้อ นำจานทดสอบไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้งจึงวัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นและแปลผลโดยใช้ตารางมาตรฐานในการแปลผลความไวต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *V. harveyi*

นำเชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ต่างๆที่บริสุทธิ์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth บ่มเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาเหวี่ยงให้ตกตะกอนโดยใช้ความเร็ว 2.800 g เป็นเวลา 10 นาที นำเชื้อที่ได้มาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นต่างๆ นำไปวัดค่าความทึบแสง (optical density : OD) ที่ 640 นาโนเมตร แล้วเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียกับกราฟมาตรฐานของเชื้อ *V. harveyi* จากนั้นนำกุ้งกุลาดำที่มีขนาดประมาณ 12-15 กรัม ทำการฉีดเชื้อในระดับต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้กุ้ง ทดลองระดับละ 10 ตัว ฉีดเชื้อเข้าที่บริเวณห้องปล้องที่ 6 ในปริมาณ 0.1 มล ของความเข้มข้นแต่ละระดับ กลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อ 1.5 เปอร์เซนต์ ในปริมาณเท่ากัน และเลี้ยงกุ้งในน้ำที่มีความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน (ppt) ที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส บันทึกเวลาและจำนวนกุ้งที่ตาย แล้วนำผลมาคำนวณหาค่า LD_{50} ตามวิธีการของ Reed and Muench (1938) แยกเชื้อแบคทีเรียจากตับและกล้ามเนื้อของกุ้งที่ป่วยตายมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อว่าเป็นเชื้อเดียวกัน

จางเชื้อที่ได้ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับค่า LD_{50} ที่ 240 ชั่วโมง จากนั้นนำกุ้งกุลาดำที่มีขนาดประมาณ 12-15 กรัม ฉีดเชื้อที่เตรียมไว้เข้าที่บริเวณท้องปล้องที่ 6 ในปริมาณ 0.1 มล กลุ่มควบคุมฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อ (NaCl 1.5%) ในปริมาณเท่ากัน และเลี้ยงกุ้งในน้ำที่มี ความเค็ม 25 ส่วนในพันส่วน ที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งกุลาดำ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อแบคทีเรีย โดยเจาะเลือดกุ้งจากชุดควบคุมและชุดติดเชื้อช่วงเวลาละ 20 ตัวๆ ละ 0.1 มล ผสมกับไตรแพนบลู (trypan blue) 0.25 เปอร์เซนต์ 0.9 มล หลังจากผสมกันดีแล้วนำมานับเม็ดเลือดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและสไลด์นับเม็ดเลือด คำนวณปริมาณเม็ดเลือดต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดอย่างอื่นเช่นปริมาณโปรตีนในซีรัม ตามวิธีการของ Lewry และคณะ (1951) น้ำตาลในน้ำเลือด ตามวิธีการของ Hyvarinen และ Nikkila (1962) ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลือด (ด้วย pH meter) ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเม็ดเลือด ตามวิธีการของ Soderhall และคณะ (1988)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

ทำการเตรียมกุ้งชุดทดลองเช่นเดียวกับการทดลองการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และทำการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำในชุดควบคุมและชุดติดเชื้อแบคทีเรียที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อ เก็บตัวอย่างตามวิธีการของ Bell และ Lightner (1988) โดยฉีด Davidson's fixative เข้าในส่วนของตับอ่อน กล้ามเนื้อ หัวใจ ในหลายๆ บริเวณ อัตราส่วน 1-2 มล ต่อกุ้ง 1 ตัว หลังจากนั้นตัดแยกส่วนหัว ลำตัว ดองในน้ำยาชนิดเดิมเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเปลี่ยนลงแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซนต์ นำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยการดูดน้ำออก (dehydration) นำพาราฟินเข้า (infiltration) และนำมาตัดให้มีความบาง 3-5 ไมครอน ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซัยลิน และอีโอซิน (Bell and Lightner. 1988) ทำการตรวจสอบผลและบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาโดยเปรียบเทียบกุ้งปกติและกุ้งที่ติดเชื้อ