



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10450-2550

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10450-2007

การชันสูตรโรคทอราซินโดรมในกุ้ง

DIAGNOSIS OF TAURA SYNDROME IN SHRIMP

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220

ISBN XXX-XXX-XXX-X



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10450-2550

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10450-2007

การชันสูตรโรคทอราซินโดรมในกุ้ง

DIAGNOSIS OF TAURA SYNDROME IN SHRIMP

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ถนนราชดำเนินนอก เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200

โทรศัพท์ 0 2283 1600 www.acfs.go.th

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 124 ตอนพิเศษ 78 ง

วันที่ 29 มิถุนายน พุทธศักราช 2550

คณะอนุกรรมการเฉพาะกิจพิจารณาร่างมาตรฐานการชันสูตรโรคในสัตว์น้ำ

- | | | |
|-----|---|------------------|
| 1. | อธิบดีกรมประมง
(นายสิทธิ บุญรัตน์ผลีน
นายจรัสธาดา กรรณสูต) | ประธานอนุกรรมการ |
| 2. | ผู้แทนกรมประมง
(นายสมเกียรติ์ กาญจนาคาร) | |
| 3. | ผู้แทนกรมปศุสัตว์
(นางมณฑกานต์ วงศ์ภากร) | อนุกรรมการ |
| 4. | ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
(Prof. Timothy William Flegel
นางวรรณสิกา เกียรติปฐมชัย) | อนุกรรมการ |
| 5. | ผู้แทนคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(นายนนทวิทย์ อารีย์ชน
นายประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภูมิ) | อนุกรรมการ |
| 6. | ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางสาวเมทนี สุกนธรักษ์) | อนุกรรมการ |
| 7. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(นายจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์) | อนุกรรมการ |
| 8. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(นางปาริยา อุดมกุศลศรี) | อนุกรรมการ |
| 9. | ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
(นายคมกริช พิมพภักดี
นายประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช) | อนุกรรมการ |
| 10. | ผู้แทนสมาคมเวชศาสตร์ชันสูตรทางสัตวแพทย์ไทย
(นางสาวเจนนุช ว่องธวัชชัย) | อนุกรรมการ |
| 11. | ผู้ทรงคุณวุฒิ และผู้เชี่ยวชาญ (เฉพาะคราวประชุม)
(นางสุปราณี ชินบุตร
นางสาวจิราพร เกษรจันทร์
นายวิศณุ บุญญาวิวัฒน์) | อนุกรรมการ |

12. ผู้แทนสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางสาวตรุณี ทันทสุวรรณ)

อนุกรรมการและเลขานุการ

13. ผู้แทนสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นายสมเกียรติ ศรีพิสุทธิ)

อนุกรรมการและ
ผู้ช่วยเลขานุการ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การขนส่งโรคทอราซินโดรมในกุ้ง เป็นข้อกำหนดสำหรับให้การรับรองการปลอดโรคทอราซินโดรมในกุ้ง และใช้เป็นคู่มือการขนส่งโรคทอราซินโดรมในกุ้งในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบผกผัน เพื่อส่งเสริมระบบการผลิต และสร้างความเชื่อมั่นในการซื้อขายกุ้งและผลิตภัณฑ์ ทั้งภายในประเทศและเพื่อการส่งออก

มาตรฐานนี้กำหนดขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

1. Bondad-Reantaso MG, McGladdery SE, East I. and Subasinghe RP 2001. Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper No. 402, Supplement 2. FAO. Rome, Italy.
2. OIE 2003. Taura Syndrome., Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Chapter 4.1.1. World Organisation for Animal Health. Paris, France.



ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ : การชั้นสูตรโรคทอราซินโดรมในกุ้ง
พ.ศ.2550

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ในการประชุมครั้งที่ 1/2550 เมื่อวันที่ 2 พฤษภาคม 2550 มีมติเห็นชอบให้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรคทอราซินโดรมในกุ้ง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพ การอำนวยความสะดวกทางการค้า และการคุ้มครองผู้บริโภค

ดังนั้น อาศัยอำนาจของคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งแต่งตั้งโดยมติคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 3 เมษายน 2550 จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรคทอราซินโดรมในกุ้ง ไว้เป็นมาตรฐานสมัครใจ ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ ๒๑ พฤษภาคม พ.ศ. 2550

(ศาสตราจารย์ อีระ สุตะบุตร)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ประธานกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

การชันสูตรโรคทอราซินโดรมในกุ้ง

1. ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ กำหนดรายละเอียดที่สำคัญเกี่ยวกับการชันสูตรโรคทอราซินโดรมในกุ้งทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา และปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอร์แบบผกผัน

2. นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 กุ้ง (shrimp) หมายถึง สัตว์ในสกุล *Penaeus*

2.2 โรคทอราซินโดรม (Taura syndrome, TS) หมายถึง โรคในกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสทอรา (Taura syndrome virus, TSV) มักพบในกุ้งขาว กุ้งที่ติดเชื้อมักพบรอยโรค (lesion) สีแดงเข้มรูปร่างไม่แน่นอนที่เปลือกบริเวณแพนหางและหาง (appendage) และตายอย่างรวดเร็ว ถ้ากุ้งไม่ตายต่อมาจะปรากฏรอยโรคสีตำรูปร่างไม่แน่นอนที่เปลือก

2.3 การชันสูตรโรค (diagnosis) หมายถึง การตรวจสอบเพื่อการวินิจฉัยโรค

2.4 กุ้งวัยอ่อน (larva) หมายถึง ลูกกุ้งที่เพิ่งออกจากไข่ และมีการเปลี่ยนรูปร่าง 3 ระยะ คือ นอเพลียส (nauplius) โซเอีย (zoea) และไมซิส (mysis) รวมใช้เวลาประมาณ 13 วัน

2.5 กุ้งหลังวัยอ่อน (post larva, PL) หมายถึง กุ้งที่มีรูปร่างเหมือนกุ้งเต็มวัย มีขนาดประมาณ 5 mm และใช้เวลาในการเจริญเติบโตจากระยะไมซิส อีกประมาณ 25 วันหรือมากกว่า เพื่อเจริญเข้าสู่วัยรุ่น นิยมเขียนย่อว่า PL แล้วตามด้วยจำนวนวันหลังวัยอ่อน เช่น PL21 หมายถึง กุ้งหลังวัยอ่อน 21 วัน

2.6 กุ้งวัยรุ่น (juvenile) หมายถึง กุ้งที่มีขนาด 2 cm ถึง 3 cm มีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย แต่ยังสืบพันธุ์ไม่ได้

2.7 กุ้งโตเต็มวัย (adult) หมายถึง กุ้งโตเต็มที่ และสามารถสืบพันธุ์ได้

2.8 เลือด (haemolymph) หมายถึง ของเหลวที่มี heme ไหลเวียนอยู่ในช่องว่าง หรือ haemocoel ของร่างกายสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งทำหน้าที่เช่นเดียวกันกับเลือดและน้ำเหลืองในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

2.9 พาหะนำโรค (carrier) หมายถึง สัตว์มีเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค โดยไม่แสดงอาการป่วย

2.10 วิธีทดสอบเบื้องต้น (presumptive test) หมายถึง วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่สะดวกหรือรวดเร็ว เช่น วิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว (rapid staining test) วิธีทางจุลพยาธิวิทยา วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

2.11 วิธีทดสอบยืนยัน (confirmation test) หมายถึง วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการยืนยันผลการชันสูตรโรค และเป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีความจำเพาะและความไวสูง

3. การชันสูตรโรค

การชันสูตรโรคทอราซินโดรมในกิ้งด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ เช่น วิธีทางจุลพยาธิวิทยา วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบผกผัน (RT-PCR) วิธี *In-situ* hybridization วิธี ELISA เมื่อได้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแล้ว สัตวแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญควรพิจารณาอาการป่วยของกิ้ง ประวัติทางวิทยาการระบาด และพยาธิกำเนิดร่วมด้วย (ภาคผนวก ก) เพื่อให้การรักษาและป้องกันโรค เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้วิธีการชันสูตรแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกัน (ภาคผนวก ข)

วิธีชันสูตรโรคทอราซินโดรมเบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการที่แนะนำให้ใช้ในมาตรฐานนี้ คือ วิธีทางจุลพยาธิวิทยา กรณีที่ผลเป็นลบ จะต้องใช้วิธีทดสอบยืนยันด้วยวิธี RT-PCR หรือวิธี *In-situ* hybridization เนื่องจากมีความจำเพาะและความไวสูง ซึ่งการเลือกใช้วิธีชันสูตรโรคทอราซินโดรมขึ้นกับวัตถุประสงค์และชนิดตัวอย่างที่เก็บ เช่น การตรวจรับรองพ่อแม่พันธุ์ก่อนเพาะฟัก และลูกกิ้งก่อนปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดิน หรือกิ้งที่สงสัยว่าติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ ควรใช้วิธี RT-PCR สำหรับการชันสูตรกิ้งระยะที่เลี้ยงในบ่อดินให้ใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยา หรือวิธีชันสูตรทางเลือกอื่นๆ

3.1 การชักตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างที่ต้องส่งตรวจให้เป็นไปตามภาคผนวก ค ตารางที่ ค.1

3.2 วิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological method)

หลักการของวิธีนี้คือ วิธีทดสอบโรคในระดับเนื้อเยื่อ โดยย้อมเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการรักษาให้คงสภาพด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin, H&E) และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

3.2.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

- (1) นำกิ้งมีชีวิตแช่ในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน (Davidson's fixative) (ภาคผนวก ง ข้อ ง.1.1) ที่แช่เย็น และมีปริมาตรประมาณ 10 เท่าของปริมาตรกิ้ง โดย

- (1.1) กุ้งวัยอ่อนระยะนอเพลียส ถึง PL20 สามารถเก็บรักษาสภาพทั้งตัวได้ในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน

- (1.2) กุ้ง PL21 จนถึงกุ้งที่มีน้ำหนักไม่เกิน 3 g ให้รักษาสภาพทั้งตัวโดยแช่ในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน โดยเปิดเปลือกส่วนหัวตามแนวยาว เพื่อให้สารละลายเข้าไปที่ตับและตับอ่อน
- (1.3) กุ้งที่มีน้ำหนักตั้งแต่ 3 g ขึ้นไป ให้ฉีดยาละลายคงสภาพเดวิดสันเข้าไปในช่องปาก ส่วนหัวด้านหลังใต้เปลือก ตับและตับอ่อนส่วนท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้าย และลำตัวทั้งด้านท้องและด้านหลังให้ทั่ว ด้วยสารละลายคงสภาพเดวิดสัน ประมาณ 1 ml ถึง 10 ml ขึ้นอยู่กับขนาดกุ้ง ตัดเปลือกกุ้งตามแนวยาวตั้งแต่เปลือกช่วงท้องปล้องที่ 6 จนถึงส่วนหัว เพื่อให้สารละลายกระจายทั่วตัว
- (1.4) กุ้งที่มีน้ำหนักมากกว่า 12 g ให้ฉีดยาละลายคงสภาพเดวิดสันเข้าไปในส่วนหัว และส่วนลำตัวด้านท้อง จากหัวไปหางให้ทั่วตัว หลังจากนั้นให้ตัดตามขวางบริเวณส่วนหัวและส่วนท้อง
- (2) นำตัวอย่างตาม (1) แช่ในสารละลายคงสภาพเดวิดสันนาน 24 h ถึง 48 h ขึ้นอยู่กับขนาดของกุ้ง แล้วนำตัวอย่างมาแช่ในเอทานอล 70% เพื่อช่วยให้เก็บตัวอย่างได้นานขึ้น

3.2.2 วิธีการ

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.2.1 มาดำเนินการ ดังนี้

- (1) ขจัดน้ำ (dehydration) ออกจากชิ้นเนื้อด้วยเอทานอล 95% และเอทานอล 100% ตามลำดับ
- (2) ขจัด (clearing) เอทานอลด้วยไซลีน
- (3) ทำให้พาราฟินแทรกเข้าไปในชิ้นเนื้อ (impregnating)
- (4) ฝังชิ้นเนื้อ (embedding) ในพาราฟิน
- (5) ตัดชิ้นเนื้อที่อยู่ในแท่งพาราฟินให้เป็นแผ่นบาง ๆ (sectioning) แล้วจัดวางบนสไลด์
- (6) ย้อมด้วยสี H&E
 - (6.1) ละลายพาราฟินในเนื้อเยื่อบนสไลด์ โดยวางสไลด์ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 min แล้วนำไปแช่ในไซลีน
 - (6.2) ทำเนื้อเยื่อบนสไลด์ให้ชุ่มน้ำ (rehydration) โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อในเอทานอล 100% และเอทานอล 95% ตามลำดับ
 - (6.3) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อด้วยน้ำไหลผ่าน นาน 5 min
 - (6.4) จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในสี Mayer's hematoxylin นาน 5 min ถึง 7 min
 - (6.5) ล้างสไลด์เนื้อเยื่อด้วยน้ำไหลผ่านนาน 15 s ถึง 30 s
 - (6.6) จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อในสีอีโอซิน นาน 30 s ถึง 60 s
 - (6.7) ขจัดน้ำออกจากสไลด์เนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 95% และเอทานอล 100% ตามลำดับ

(6.8) จัดเอทานอล โดยแช่ในโซลิน

(6.9) หยดเพอร์เมาท (permount) 1 หยด ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์

(6.10) นำสไลด์เนื้อเยื่อมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

3.2.3 การแปลผล

กุ้งที่ติดเชื้อ TSV ในระยะต่างๆ จะพบลักษณะของเนื้อเยื่อดังต่อไปนี้

3.2.3.1 กุ้งที่ติดเชื้อในระยะเฉียบพลัน

พบหย่อมเนื้อตายในเยื่อบุผิวได้เปลือกบริเวณลำตัว (รูปที่ จ.3) รยางค์ เหงือก หลอดอาหาร และกระเพาะอาหาร (รูปที่ จ.4) บางครั้งพบได้ทั้งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เปลือก และกล้ามเนื้อโครงร่างที่ติดกับเยื่อบุผิว แต่แทบจะไม่พบที่เยื่อบุผิวของต่อมแอนเทนนา (antennal gland) ไม่พบการแทรกเข้ามาของเม็ดเลือดซึ่งเป็นปฏิกิริยาการอักเสบ พบว่าในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ที่ติดเชื้อมีกลุ่มตะกอนไวรัส เห็นเป็นจุดกลมติดสีแดงถึงน้ำเงินอ่อน (eosinophilic to pale basophilic cytoplasmic inclusions) นิวเคลียสตายเห็นเป็นจุดเข้ม (pyknotic nuclei) หรือแตกออกเป็นจุดเล็กๆ (karyorrhectic nuclei) เพิ่มมากขึ้น (รูปที่ จ.5) จึงรวมเรียกลักษณะที่เห็นนี้ว่า peppered หรือ buckshot-riddled

3.2.3.2 กุ้งที่ติดเชื้อในระยะฟื้นตัว

พบรอยโรคที่เยื่อบุผิวน้อยลง แต่จะพบการสะสมของเม็ดเลือดมากขึ้น (infiltration and accumulation of haemocytes) ทำให้เกิดเป็นรอยสีดำ (melanisation) และอาจพบการลอกหลุดของชั้น cuticle และการรวมกลุ่มของแบคทีเรีย เช่น *Vibrio* spp.

3.2.3.3 กุ้งที่ติดเชื้อในระยะเรื้อรัง

ไม่พบรอยโรคที่เยื่อบุผิวได้เปลือก แต่จะพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ lymphoid organ spheroids (รูปที่ จ.6)

3.3 วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบผกผัน (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

หลักการของวิธีนี้ คือ การตรวจหา RNA ของเชื้อ TSV โดยในขั้นตอนแรกต้องเปลี่ยน RNA เป็น DNA ก่อน แล้วจึงเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อแบบทวีคูณจนมีจำนวนมากพอที่จะสามารถตรวจพบได้

วิธี RT-PCR ที่ใช้ในมาตรฐานนี้ดัดแปลงจาก Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals ของ OIE¹, 2003

¹ องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (Office International des Epizooties, OIE หรือ World Organisation for Animal Health) หมายถึง องค์การระหว่างประเทศ ที่ประกอบด้วยผู้แทนรัฐบาล จัดตั้งขึ้นตามข้อตกลงของประเทศต่างๆ เพื่อประสานความร่วมมือในการควบคุมโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์ เมื่อเดือนมกราคม 2467

3.3.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

- (1) นำตัวอย่างกุ้งมีชีวิตพร้อมน้ำจากบ่อเลี้ยงใส่ถุงพลาสติกหรือภาชนะอื่นที่เหมาะสม แยกตัวอย่างแต่ละบ่อไม่ปะปนกัน เขียนรายละเอียดให้ชัดเจน และขนส่งในสภาพมีชีวิตจนถึงห้องปฏิบัติการ
- (2) ถ้าไม่สามารถนำตัวอย่างกุ้งมีชีวิตส่งตรวจได้ ให้นำตัวอย่างกุ้งใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท แช่น้ำแข็ง แล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันทีหรือภายใน 24 h หากไม่สามารถส่งตัวอย่างภายในวันนั้นได้ ให้แช่แข็งตัวอย่างกุ้งทั้งตัว (frozen whole specimens) ในน้ำแข็งแห้งหรือในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20°C หรือต่ำกว่า แล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการ
- (3) ถ้าไม่สามารถนำตัวอย่างกุ้งมีชีวิตหรือแช่แข็งส่งห้องปฏิบัติการได้ ให้รักษาสภาพตัวอย่างกุ้งในเอทานอล 90% ถึงเอทานอล 95% ที่เย็น ปริมาตรประมาณ 10 เท่าของตัวอย่างกุ้ง ส่งตรวจภายใน 3 วัน แต่ถ้าต้องการเก็บตัวอย่างกุ้งให้นานขึ้น ให้ใช้สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ง ข้อ ง.1.2) โดยถ้าเป็นกุ้งวัยรุ่นขึ้นไปให้เก็บตัวอย่างเหงือกหรือขาว่ายน้ำ (pleopod) ส่งตรวจ ถ้ากุ้งมีขนาดเล็กกว่า 3 g ให้รักษาสภาพตัวอย่างกุ้งทั้งตัวได้ แต่ต้องนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 7 วัน เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส
- (4) ถ้าเก็บตัวอย่างเลือด (haemolymph) ส่งตรวจ ให้เก็บตัวอย่างเลือดกุ้งจากแอ่งเลือด (haemocoel) ที่ได้ทั้งบริเวณขาว่ายน้ำคู่แรก หรือบริเวณขาเดิน (periopod) คู่ที่ 3 ถึงคู่สุดท้าย (รูปที่ จ.2) หรือที่หัวใจ ด้วยเข็มและกระบอกฉีดยาที่มีสารละลายรักษาสภาพเลือด (citrate buffer) (ภาคผนวก ง ข้อ ง.1.3) ในปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเลือด แล้วแช่เย็นตัวอย่างเลือดกุ้งและนำส่งห้องปฏิบัติการ ภายใน 8 h หรือ
 - (4.1) เก็บรักษาสภาพตัวอย่างเลือดกุ้งในสารละลายรักษาสภาพ RNA โดยดำเนินการดังนี้
 - (4.1.1) ดูดตัวอย่างเลือดกุ้งที่ผสมสารละลายรักษาสภาพเลือด ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ปั่นเหวี่ยงที่ 500 g ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 min
 - (4.1.2) ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง โดยระวังไม่ให้โดนส่วนของเซลล์เม็ดเลือดที่ก้นหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์
 - (4.1.3) หยดสารละลายรักษาสภาพ RNA เช่น trizol หรือ RNA purification tests ชนิดอื่นๆ ให้ท่วมส่วนของเม็ดเลือดที่ก้นหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วผสมให้เข้ากันเบาๆ
 - (4.1.4) เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20°C ถึง -80°C รอจนกว่าจะตรวจ
 - (4.2) หยดเลือดปริมาตร 30 μl ลงบนกระดาษกรอง IsocodeTM (หรือกระดาษกรองชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติเทียบเท่า) ปลอ่ยให้แห้ง จะเก็บรักษาสภาพตัวอย่างเลือดได้นาน 3 เดือน

3.3.2 วิธีการ

3.3.2.1 การสกัด RNA

- (1) ปริมาณตัวอย่างกึ่งที่ใช้ในการสกัด RNA จะขึ้นกับชนิดของตัวอย่าง ดังนี้ (ให้ดำเนินการขั้นตอนต่อไปนี้ ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C)
 - (1.1) ถ้าตัวอย่างเป็นกึ่งที่มีขนาดใหญ่ เช่น กึ่งวุ้นรูน หรือกึ่งโตเต็มวัย ใช้เนื้อเยื่อกึ่ง 25 mg ถึง 75 mg เติม trizol 150 µl บดให้เข้ากัน จากนั้นเติม trizol อีก 850 µl ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1 000 µl
 - (1.2) ถ้าตัวอย่างเป็นกึ่งระยะ PL ให้ใช้กึ่ง 300 ตัว เติม trizol 1 000 µl บดให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งตัวอย่างมา 150 µl แล้วเติม trizol อีก 850 µl ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1 000 µl
 - (1.3) ถ้าตัวอย่างเป็นเม็ดเลือดกึ่ง ให้เติม trizol 750 µl ลงในตัวอย่างเม็ดเลือด ผสมให้เข้ากัน นาน 20 s
- (2) นำตัวอย่างข้อ (1) มาบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 5 min
- (3) ปั่นเหวี่ยงที่ 12 000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 min ดูดสารละลายส่วนบนถ่ายสู่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ใหม่
- (4) เติมคลอโรฟอร์ม 200 µl ผสมให้เข้ากันกับตัวอย่าง นาน 20 s
- (5) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 min
- (6) ปั่นเหวี่ยงที่ 12 000 g ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 min ดูดสารละลายใสส่วนบนถ่ายสู่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ใหม่
- (7) เติม isopropanol 670 µl ผสมให้เข้ากัน
- (8) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นานอย่างน้อย 10 min หรือบ่มที่อุณหภูมิ -20 °C นานข้ามคืน หรือที่อุณหภูมิ -70 °C นาน 1 h
- (9) ปั่นเหวี่ยงที่ 12 000 g ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 min ดูดสารละลายทิ้ง
- (10) ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 0.5 ml นานอย่างน้อย 30 min ที่อุณหภูมิ 25 °C
- (11) ปั่นเหวี่ยงที่ 12 000 g ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 min ดูดส่วนสารละลายส่วนบนทิ้ง
- (12) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นานประมาณ 20 min หรือจนกว่าตะกอนแห้ง
- (13) เติม EDTA 150 µl สำหรับปริมาณตัวอย่างเนื้อเยื่อตั้งต้น 50 mg ถ้าเป็นเลือดกึ่งปริมาตร 250 µl ให้เติม EDTA 75 µl บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 15 min ผสมเบาๆ ให้เข้ากันนำไปใช้ในขั้นตอนสร้าง cDNA (complementary DNA)

3.3.2.2 การสร้าง cDNA

- (1) ใช้ RNA ที่สกัดจากเลือดกึ่งหรือเนื้อเยื่อ ที่มีความเข้มข้นของ RNA ประมาณ 1 ng/ml ถึง 100 ng/ml เป็น RNA ต้นแบบ (template RNA)
- (2) ตรวจสอบตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (specific primer) คือ ไพรเมอร์ รหัส 9195 และ 9992 ซึ่งจะให้ PCR product ที่มีขนาด 231 bp (base pair) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของไพรเมอร์ รหัส 9195 และ 9992

Primer	Sequence	G:C ratio	Melting temperature
9195	5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	50	63 °C
9992	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	55	69 °C

- (3) ต้องมีชุดควบคุมทุกครั้งที่ทำ RT-PCR ซึ่งประกอบด้วย negative control, positive control และ blank (non-template control)
- (4) สามารถใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (commercial RT-PCR kits) ได้ในทุกขั้นตอน
- (5) สภาพที่เหมาะสมของ RT-PCR ในการตรวจหาเชื้อ TSV ในกึ่ง หากต้องการส่วนผสมปริมาตร 50 µl ต้องมีองค์ประกอบดังนี้ คือ
 - ไพรเมอร์ (0.46 µmol each)
 - dNTPs (300 µmol each)
 - rTth DNA polymerase (2.5 U/50 µl)
 - manganese acetate (2.5 mmol) ใน 5X EZ buffer (ภาคผนวก ง ข้อ ง.2.1)

หมายเหตุ สำหรับตรวจหาเชื้อ TSV ในกึ่ง *P. stylirostris* ให้ทำเช่นเดียวกัน แต่ควรเพิ่มปริมาณ rTth DNA polymerase เป็น 5.0 U/50 µl

- (6) นำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR ในขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิ หากหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ใช้ไม่มีฝาปิดชนิดที่ทนอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นได้ ให้เติม mineral oil 50 µl ลงบนสารผสมนั้น เพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย
- (7) ตั้งโปรแกรม 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 min ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ของ RNA ต้นแบบ ให้เป็น cDNA จากนั้นให้เพิ่มอุณหภูมิเป็น 94 °C นาน 2 min

หมายเหตุ ค่าต่างๆ (conditions) ที่อธิบายในที่นี้ เป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับเครื่อง automatic DNA thermal cycler 480 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) สำหรับเครื่อง thermal cycler รุ่นอื่นๆ ให้ optimized conditions โดยใช้ positive control ก่อน

3.3.2.3 การเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย

- (1) เมื่อทำขั้นตอน RT เสร็จแล้ว เพิ่มจำนวน DNA โดยตั้งโปรแกรมเป็น 35 รอบ ให้ตั้งขั้นตอน denature ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 45 s ขั้นตอน annealing และ extension ทำพร้อมกันที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 45 s และรอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 7 min แล้วเก็บ PCR products ซึ่งมี DNA ไวที่อุณหภูมิ 4 °C
- (2) ดูดสารละลาย DNA ออกจาก mineral oil ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 0.5 ml
- (3) แยกแถบ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังนี้
 - (3.1) ผสมสีย้อมกับสารละลาย DNA ที่ได้ เติมลงในหลุมของ agarose gel ความเข้มข้น 2% ประมาณ 10 µl
 - (3.2) แยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า ในสารละลาย 0.5X TBE (ภาคผนวก ง ข้อ ง.2.2)
 - (3.3) แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide (0.5 µg/ml) หรือใช้สารย้อม DNA ชนิดอื่น
 - (3.4) ใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker

หมายเหตุ อาจใช้ไฟรเมอร์ เวลา อุณหภูมิ สารเคมี และเครื่องมือที่แตกต่างจากที่กล่าวข้างต้นได้ หากได้ทดสอบแล้วว่ามีควมไวและความจำเพาะเทียบเท่าหรือดีกว่า และได้รับการเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ

ข้อควรระวัง

- เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของ DNA และ RNase ต้องแยกพื้นที่ วัสดุ และอุปกรณ์จากการสกัด DNA ในขั้นตอนการสกัดและผสม PCR cocktail
- ควรใช้ filter tip ในขั้นตอนการผสม PCR cocktail และการเตรียม template RNA

3.3.3 การแปลผล

- (1) เมื่อพบแถบ DNA ที่ขนาด 231 bp ให้อ่านผลเป็นบวก เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control
- (2) เมื่อไม่พบแถบ DNA ที่ขนาด 231 bp ให้อ่านผลเป็นลบ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control

3.4 วิธี *In-situ* hybridisation with non-radioactive cDNA

หลักการของวิธีนี้คือ การตรวจหา RNA หรือ DNA ของเชื้อ TSV ในเนื้อเยื่อ โดยใช้ cDNA strand เข้าจับ RNA หรือ DNA ที่ต้องการ

วิธีต่อไปนี้อ้างตาม Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals ของ OIE, 2003 โดยใช้ DIG-labelled cDNA probe ที่ผลิตเองในห้องปฏิบัติการ หรืออาจใช้ probe ที่ผลิตเป็นการค้า เช่น ShrimProbe™ kit หรือ probe ที่ผลิตโดยวิธี PCR ด้วยไฟรเมอร์ รหัส 9155 และ 9992

3.4.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

เช่นเดียวกับวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ข้อ 3.2.1 แต่หลังจากแช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน นาน 24 h แล้วให้ดำเนินการในขั้นตอนต่อไปทันที หากไม่สามารถดำเนินการได้ให้ใช้ RNA friendly fixative (R-F fixative) (ภาคผนวก ง ข้อ ง.3.3) แทน โดยแช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อ นาน 24 h ถึง 48 h หลังจากนั้นนำไปแช่ในเอทานอล 70% จะรักษาตัวอย่างได้นาน 2 สัปดาห์

3.4.2 วิธีการ

3.4.2.1 นำเนื้อเยื่อจากข้อ 3.2.2 (5) ที่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยา ให้ทำปฏิกิริยากับ DIG-labelled cDNA probe โดยเลือก paraffin-embedded เฉพาะส่วน cuticular epithelium และ lymphoid organ หรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น เหงือกหรือทางเดินอาหารของกุ้งติดเชื้อ ทั้งในระยะเฉียบพลันและระยะเรื้อรัง ตัดให้ได้ความหนา 4 μm ถึง 6 μm วางลงบน pre-treated slides หรือสไลด์ที่มีประจุบวก จากนั้นนำไปอบในตู้อบเชื้อ ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}\text{C}$ เพื่อให้พาราฟินบางส่วนละลายออก จากนั้นดำเนินการดังต่อไปนี้

3.4.2.2 ขั้นตอนการเอาพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (deparaffinisation)

แช่เนื้อเยื่อในโซลีน นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง

3.4.2.3 ขั้นตอนการทำให้เนื้อเยื่อชุ่มน้ำ (rehydration)

(1) แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 100% นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง

(2) แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 95% นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง

(3) แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 70% นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง

(4) แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 50% นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง

(5) แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น นาน 5 min

3.4.2.4 ขั้นตอนก่อนไฮบริไดเซชัน (pre-hybridisation treatment)

(1) หยด proteinase K 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ให้ท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ นาน 15 min อย่างไรก็ดี ต้องทดสอบหาความเหมาะสมของความเข้มข้นของ proteinase K และเวลาที่ใช้ในการย่อยก่อน

(2) นำเนื้อเยื่อแช่ใน phosphate-buffer saline (PBS) (phosphate buffer 10 mmol, NaCl 150 mmol, pH 7.2) นานครั้งละ 5 min 3 ครั้ง

(3) หยด acetic acid 20% ให้ท่วมเนื้อเยื่อทิ้งไว้ นาน 20 s

(4) นำเนื้อเยื่อแช่ใน standard saline citrate (SSC) (NaCl 0.3 mol, sodium citrate 30 mmol, pH 7.0) 2X นานครั้งละ 2 min 2 ครั้ง

(5) นำเนื้อเยื่อแช่ในน้ำกลั่น นาน 5 min

(6) ปลอຍเนื้อเยื่อให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง

3.4.2.5 ขั้นตอนไฮบริไดเซชัน (hybridisation)

- (1) ละลาย DIG-labelled cDNA probe ด้วย hybridisation buffer (ภาคผนวก ง ข้อ 3.2) ในอัตราส่วน 1:20 ผสมให้เข้ากันดี นำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 °C ถึง 100 °C นาน 5 min เมื่อครบเวลาให้นำ probe แช่ลงในน้ำแข็งทันทีนาน 5 min
- (2) หยด hybridisation buffer with probe ที่ได้จากข้อ (1) ปริมาตร 50 µl ลงบนกระจกปิดสไลด์ แล้วค่อยๆ นำสไลด์ด้านที่มีเนื้อเยื่อแต่ละลงบนบริเวณที่มี buffer รอให้ buffer กระจายทั่วเนื้อเยื่อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในกล่องเก็บความชื้นนานข้ามคืน

3.4.2.6 ขั้นตอนการล้างและการขัดขวางการจับที่ไม่จำเพาะ (washing and blocking)

- (1) นำกระจกปิดสไลด์ออกจากสไลด์ และแช่เนื้อเยื่อใน SSC 2X ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 min
- (2) แช่เนื้อเยื่อใน SSC 2X ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 min
- (3) แช่เนื้อเยื่อใน SSC 1X ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 min
- (4) แช่เนื้อเยื่อใน SSC 0.5X ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 h
- (5) แช่เนื้อเยื่อใน tris-buffered saline (TBS) (tris-HCl 50 mmol, NaCl 100 mmol, pH 7.2) นาน 5 min
- (6) หยด skim milk 1% ให้ท่วมเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 h
- (7) แช่เนื้อเยื่อใน TBS pH 7.2 นาน 5 min

3.4.2.7 ขั้นตอนการตรวจ (detection)

- (1) นำ goat anti-digoxigenin มาเจือจางใน bovine serum albumin (BSA) 3% ให้เป็น 1:300 หยดให้ท่วมเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 h
- (2) แช่เนื้อเยื่อใน TBS pH 7.2 นานครั้งละ 5 min 3 ครั้ง
- (3) แช่เนื้อเยื่อใน TBS pH 9.5 นาน 5 min
- (4) หยด nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) ให้ท่วมเนื้อเยื่อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 min ถึง 30 min
- (5) แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น นาน 3 min
- (6) หยด nuclear fast red หรือ Bismark brown ให้ท่วมเนื้อเยื่อ นาน 5 min
- (7) แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 50% นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง
- (8) แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 70% นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง
- (9) แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 95% นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง
- (10) แช่เนื้อเยื่อในเอทานอล 100% นานครั้งละ 5 min 2 ครั้ง
- (11) แช่เนื้อเยื่อในไซลีน 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 min

(12) ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงส่องผ่าน

3.4.3 การแปลผล

หากมีเชื้อ TSV จะติดสีน้ำเงินถึงน้ำเงินเข้มในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับ ส่วนนิวเคลียสที่ตาย (karyorrhectic nuclear fragments และ pyknotic nuclei)

ภาคผนวก ก

วิทยาทางระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคทอราซินโดรม

ก.1 วิทยาทางระบาด

โรคทอราซินโดรม หรือเรียกว่าโรคทีเอส เป็นโรคระบาดร้ายแรงในกุ้งขาวหรือ Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei* หรือ *Litopenaeus vannamei*) มีสาเหตุจากเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) ซึ่งจัดอยู่ใน Family Picornaviridae มีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว (ssRNA) ซึ่งเจืออยู่ในไซโตพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ ไวรัสนี้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 32 nm ไม่มีผนังหุ้ม (non-enveloped) รูปร่างเป็นแบบ icosahedrons ความหนาแน่น 1.338 g/ml

โรคนี้มียารายงานเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2535 ในกุ้งขาวที่ประเทศเอกวาดอร์ ต่อมาโรคได้แพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในฟาร์มกุ้งในทวีปอเมริกา ตลอดจนชายฝั่งแปซิฟิกตั้งแต่ประเทศเปรูถึงเม็กซิโก หมู่เกาะฮาวาย พื้นที่ชายฝั่งแอตแลนติก ทะเลแคริบเบียน และอ่าวเม็กซิโก ในปี พ.ศ. 2545 โรคทอราซินโดรมได้ลุกลามมาสู่ทวีปเอเชีย โดยติดมากับกุ้งขาวที่นำเข้าจากอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และในปี พ.ศ. 2546 ได้พบการระบาดของโรคนี้เป็นครั้งแรกในกุ้งขาวที่เลี้ยงในภาคกลางของประเทศไทย ต่อมาในต้นปี พ.ศ. 2547 มีการตรวจพบโรคนี้ในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้มียารายงานการตรวจพบเชื้อนี้ในกุ้งชนิดอื่นได้ด้วย เช่น *P. stylirostris*, *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. merguensis* (กุ้งแชบ๊วย), *P. monodon* (กุ้งกุลาดำ)

ด้วยเหตุที่โรคทอราซินโดรมมีความร้ายแรงและแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว องค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ จึงกำหนดให้โรคนี้อยู่ในบัญชีโรคสัตว์น้ำ และประเทศไทยได้กำหนดให้โรคนี้อยู่ในกฎกระทรวง พ.ศ. 2548 ภายใต้พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499

ก.2 พยาธิกำเนิด

เชื้อ TSV เมื่อเข้าสู่ร่างกายกุ้ง จะเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวใต้เปลือก (subcuticular epithelium) ทั้งที่ลำตัว รยางค์ เหนือก หลอดอาหาร และกระเพาะอาหาร ทำให้เซลล์ตาย และเกิดเป็นหย่อมเนื้อตาย ในบางครั้งพบได้ที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้เปลือกและกล้ามเนื้อลายที่ติดกับเยื่อบุผิว แต่แทบจะไม่พบที่เยื่อบุผิวท่อของต่อมแอนเทนนา ไม่พบการแทรกเข้ามาของเม็ดเลือด ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการอักเสบของร่างกายกุ้ง (host-inflammatory response) กุ้งที่ติดเชื้อ TSV อาจแสดงอาการป่วยหรือไม่แสดงอาการป่วยก็ได้ อย่างไรก็ตามการพบการตายของกุ้งในระยะวัยอ่อนและระยะวัยรุ่น กุ้งขาวที่ติดเชื้อ TSV ในระยะ PL จนถึงระยะใกล้โตเต็มวัย (subadult) จะมีอัตราการตายอยู่ระหว่าง 40% ถึง 90%

ก.3 อาการ

อาการของโรคที่พบแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

ก.3.1 ระยะเฉียบพลัน (acute phase)

พบสีแดงเข้มที่เปลือกกุ้ง (รูปที่ จ.1a) โดยเฉพาะบริเวณแพนหางและรยางค์อื่นๆ ได้แก่ ขาว่ายน้ำ บริเวณหางกุ้งมีสีแดงเข้มกว่าปกติ แต่ขอบสีของแพนหางมีสีซีด (รูปที่ จ.1b) เมื่อนำรยางค์มาส่องดูส่วนปลายด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง จะพบบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวตายเป็นหย่อมๆ นอกจากนี้ถ้าเป็นกุ้งในระยะลอกคราบ จะมีอัตราการตายสูง เปลือกนูน

ก.3.2 ระยะฟื้นตัว (transitional phase)

ปรากฏรอยสีดำ (melanisation) มีรูปแบบไม่แน่นอนที่เปลือก (รูปที่ จ.1c) กุ้งที่พบในระยะนี้อาจไม่มีจุดสี (chromatophore) กระจาย เปลือกไม่นูน มีการกินอาหารและพฤติกรรมปกติ

ก.3.3 ระยะเรื้อรัง (chronic phase)

กุ้งจะเข้าสู่ระยะนี้หลังลอกคราบได้สำเร็จ และไม่พบรอยสีดำที่เปลือก ในระยะเรื้อรังนี้เชื้อ TSV จะอยู่ที่ lymphoid organ spheroids (LOS) ทำให้กุ้งกลายเป็นพาหะนำโรคไปสู่กุ้งตัวอื่นๆ ได้

ภาคผนวก ข

การเปรียบเทียบความแม่นยำวิธีการชันสูตรโรค

ตารางที่ ข.1 เปรียบเทียบความแม่นยำของการชันสูตรโรคทอราซินโดรมด้วยวิธีต่าง ๆ¹

วิธีชันสูตร	แบบคัดกรอง (Screening)				แบบเบื้องต้น	แบบยืนยันผล
	กุ่มวัยอ่อน	กุ่มหลังวัยอ่อน	กุ่มวัยรุ่น	กุ่มโตเต็มวัย		
ด้วยตาเปล่า (Gross signs)	–	–	–	–	++	–
กล้องจุลทรรศน์ (direct BF/LM microscope)	–	–	–	–	++	–
จุลพยาธิวิทยา	–	+++	+++	+++	+++	+++
การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส (Bioassay)	–	–	–	–	++	++
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	–	–	–	–	+	+
อีไลซา (ELISA)	–	–	–	–	+++	+++
หัตถตรวจดีเอ็นเออินซิทู (DNA probes <i>in situ</i>)	–	+++	+++	+++	+++	+++
RT-PCR	–	+++	+++	+++	+++	+++

¹ดัดแปลงจาก Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals ของ OIE, 2003

- = ไม่มีวิธีการทดสอบหรือเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม
- +
- ++ = วิธีที่ใช้ได้ในบางกรณี เนื่องจากมีข้อจำกัดบางประการ
- +++ = วิธีมาตรฐาน ใช้กันทั่วไป มีประสิทธิภาพดีและมีความจำเพาะ
- +++ = วิธีที่แนะนำให้ใช้ เนื่องจากมีความจำเพาะและความไวสูง

BF/LM = bright field/light microscope

ภาคผนวก ค

แผนการชักตัวอย่าง

ตารางที่ ค.1 แผนการชักตัวอย่าง¹

ขนาดรุ่น	จำนวนตัวอย่าง เมื่อคาดว่าจะมีความชุกโรคที่			
	1 %	2 %	5 %	10 %
50	50	50	35	20
100	96	75	45	23
250	194	110	50	25
500	225	130	55	26
1 000	258	140	55	27
1 500	271	140	55	27
2 000	277	145	60	27
4 000	288	145	60	27
10 000	299	145	60	27
100 000 หรือ มากกว่า	299	150	60	30

¹ ดัดแปลงจาก Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals ของ OIE, 2003

หมายเหตุ

จำนวนตัวอย่างกึ่งที่ต้องสุ่มตรวจ (size of sample) ขึ้นอยู่กับความชุกโรคจุดขาวที่คาดว่าจะมี (prevalence) และขนาดรุ่น (lot size) หรือจำนวนกึ่งที่มีในบ่อ

- 1) ในการตรวจกึ่งระยะ PL ต้องใช้จำนวนตัวอย่างที่ความชุกโรค 1% ถึงความชุกโรค 2% โดยสุ่มกึ่งมีชีวิตมาจาก 5 ตำแหน่งให้ครอบคลุมพื้นที่ทั้งบ่อ หากเป็นพ่อแม่พันธุ์ให้ตรวจทุกตัวหรือที่ความชุกโรค 5% ในกรณีกุ้งวัยรุ่นให้ใช้จำนวนตัวอย่างที่ความชุกโรค 2% ถึงความชุกโรค 10%
- 2) วิธีการแปลผล ยกตัวอย่างที่ความชุกโรค 2%
 - ถ้าผลการตรวจเป็นบวก หมายความว่า มีกึ่งติดเชื้อ 2% หรือมากกว่า ในกลุ่มประชากรตัวอย่าง
 - ถ้าผลการตรวจเป็นลบ หมายความว่า มีกึ่งติดเชื้อต่ำกว่า 2% หรือไม่ติดเชื้อ ในกลุ่มประชากรตัวอย่าง

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารเคมี

ง.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

ง.1.1 สารละลายคงสภาพเดวิดสัน ปริมาตร 1 000 ml

absolute ethanol	330	ml
40% formalin	220	ml
glacial acetic acid	115	ml
distilled water		

ง.1.2 สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ ปริมาตร 1 000 ml

absolute ethanol	800	ml
glycerol	200	ml
β -mercaptoethanol	2.5	ml

ง.1.3 สารละลายรักษาสภาพเลือด ปริมาตร 1 000 ml

NaCl	26.3	g
trisodium citrate	8.8	g
citric acid	5.5	g
EDTA	3.7	g

- เติมน้ำ 700 ml แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.0 จากนั้นนำไป autoclave
- ทิ้งไว้ให้เย็น เติม 1 mol กลูโคส 100 ml (โดยชั่งกลูโคส 36 g ละลายในน้ำกลั่น 200 ml)
- เติมน้ำให้ครบ 1 000 ml

ง.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธี RT-PCR

ง.2.1 5X EZ buffer, pH 8.2

- 25 mmol bicine
- 57.5 mmol potassium acetate
- 40% (w/v) glycerol

ง.2.2 5X TBE

เตรียม 1 000 ml

tris base	54	g
boric acid	27.5	g
0.5 mol EDTA (pH 8)	20	ml

ง.3 การเตรียมอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในวิธี *In-situ* hybridisation

ง.3.1 Pre-treated slides

- 1) ล้างกระจกสไลด์ด้วย HCl 1 mol นาน 20 min และล้างด้วยน้ำประปา นาน 30 min
- 2) จุ่มสไลด์ในน้ำกลั่น และปล่อยให้แห้ง
- 3) จุ่มสไลด์ใน 2% organosilane (gamma-aminopropyltriethoxy silane) ใน acetone ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 min
- 4) ล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา นาน 30 min แล้วจุ่มลงในน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยเปลี่ยนน้ำกลั่นทุกครั้ง
- 5) นำสไลด์บ่มที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 1 h
- 6) เก็บสไลด์ที่อุณหภูมิห้องในที่ปราศจากฝุ่น

ง.3.2 Hybridisation buffer

deionized formamide	1	ml
dextran sulphate	0.2	g
20X SSPE	0.6	ml
yeast tRNA (10 mg/ml)	0.2	ml

ง.3.3 R-F fixative

100% formalin	349	ml
95% ethanol	407	ml
distilled water	222	ml
ammonium hydroxide (NH ₄ OH) (28–30% as NH ₃)	22	ml

ภาคผนวก จ
ภาพประกอบการชั้นสูตรโรคทอราซินโดรม



a



b

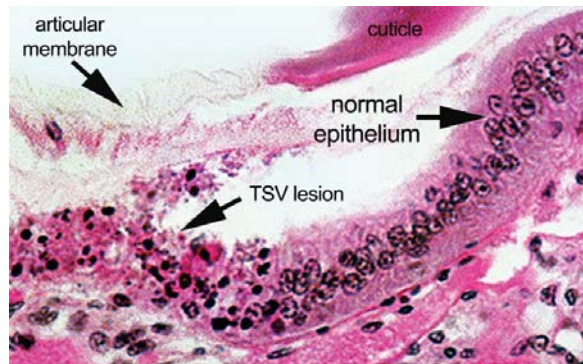


c

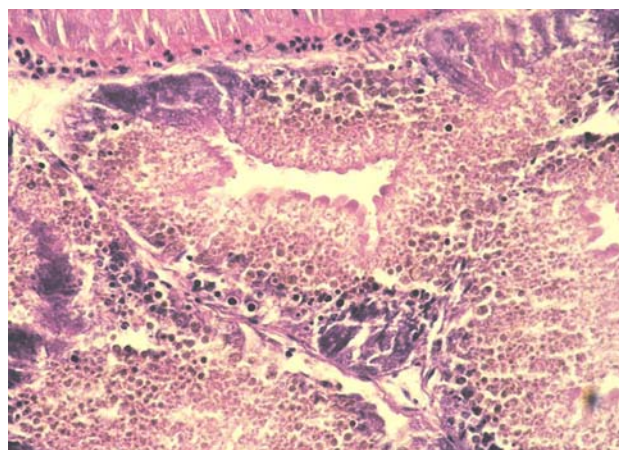
รูปที่ จ.1 ลักษณะรอยโรคของโรคทอราซินโดรมในกุ้งขาวระยะเนียบพลัน ลำตัวจะมีสีแดง เปลือกนึ่ม (a) บริเวณหางกุ้งมีสีแดงเข้มกว่าปกติ แต่ขอบสีของแพนหางมีสีซีด (b) ถ้ากุ้งรอดชีวิตจากการติดเชื้อหรือระยะฟื้นตัวจะปรากฏรอยสีดำที่เปลือก (c) (เอื้อเฟื้อภาพโดย ดร. จิราพร เกษรจันทร์)



รูปที่ จ.2 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือด จากแ่งเลือดใต้ท้องบริเวณขาว่ายน้ำคู่แรก (ventral sinus) หรือจาก แ่งเลือดใต้ท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้าย (cardiac sinus) (ลูกศร) (เอื้อเฟื้อภาพ โดย รศ.สพ.ญ.ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย)



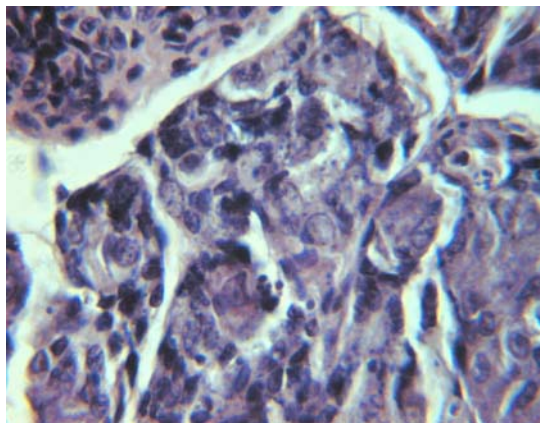
รูปที่ จ.3 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคทอราซินโดรม พบหย่อมเนื้อตายในเยื่อบุผิวใต้เปลือก (H&E stain) กำลังขยาย 1000 เท่า (เอื้อเฟื้อภาพโดย Dr. Timothy W Flegel)



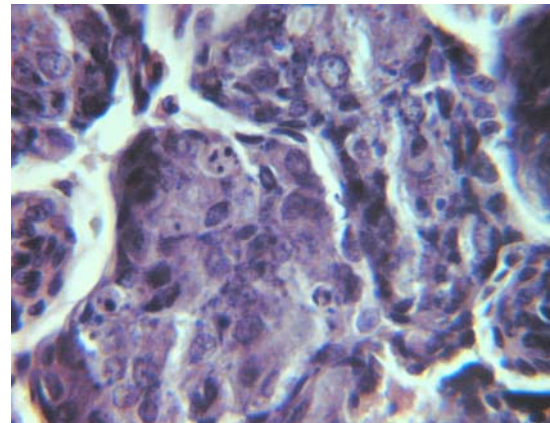
รูปที่ จ.4 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคทอราซินโดรม พบหย่อมเนื้อตายในเยื่อบุผิวลำไส้ (H&E stain) กำลังขยาย 400 เท่า (เอื้อเฟื้อภาพโดย รศ.สพ.ญ.ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย)



รูปที่ จ.5 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคทอราซินโดรม ไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อเห็นเป็นจุดกลม ติดสีแดงถึงน้ำเงินอ่อน (eosinophilic to pale basophilic cytoplasmic inclusions) นิวเคลียสเป็นจุดสีน้ำเงินเข้ม (pyknotic nuclei) (H&E stain) กำลังขยาย 1000 เท่า (เอื้อเฟื้อภาพโดย Dr. Timothy W Flegel)



a



b

รูปที่ จ.6 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคทอราซินโดรม พบการกระจายของ eosinophilic cytoplasmic inclusions ที่ lymphoid organ (pyknotic and karyorrhectic nuclei) (H&E stain) กำลังขยาย 1000 เท่า (a, b) (เอื้อเฟื้อภาพโดย ดร. จิราพร เกษรจันทร์)

ภาคผนวก ข

หน่วย

หน่วยและสัญลักษณ์ที่ใช้ในมาตรฐานฯ นี้ และหน่วยที่ SI (International System of Units หรือ *Le Système International d' Unités*) ยอมรับให้ใช้ได้ มีดังนี้

ปริมาณ	ชื่อหน่วย	สัญลักษณ์หน่วย
มวล	กรัม	g
	มิลลิกรัม	mg
	ไมโครกรัม	µg
ปริมาตร	มิลลิลิตร	ml
	ไมโครลิตร	µl
ความยาว	เซนติเมตร	cm
เวลา	ชั่วโมง	h
	นาที	min
	วินาที	s
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส	°C
ปริมาณสาร	โมล	mol
	มิลลิโมล	mmol
	ไมโครโมล	µmol
ความหนาแน่นของมวล	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	mg/ml