มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10451-2550

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10451-2007

การชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้ง

DIAGNOSIS OF WHITE SPOT DISEASE IN SHRIMP

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220 ISBN XXX-XXX-XXX-X

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10451-2550

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10451-2007

การชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้ง

DIAGNOSIS OF WHITE SPOT DISEASE 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 บุณยรัตนผลิน นายจรัลธาดา กรรณสูต)	ประธานอนุกรรมการ
2.	ผู้แทนกรมประมง (นายสมเกียรติ์ กาญจนาคาร)	
3.	ผู้แทนกรมปศุสัตว์ (นางมณฑกานติ์ วงศ์ภากร)	อนุกรรมการ
4.	ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (Prof. Timothy William Flegel นางวรรณสิกา เกียรติปฐมชัย)	อนุกรรมการ
5.	ผู้แทนคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (นายนนทวิทย์ อารีย์ชน นายประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ)	อนุกรรมการ
6.	ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (นางสาวเมทนี สุคนธรักษ์)	อนุกรรมการ
7.	ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (นายจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)	อนุกรรมการ
8.	ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (นางปารียา อุดมกุศลศรี)	อนุกรรมการ
9.	ผู้แทนคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (นายคมกริช พิมพ์ภักดี นายประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช)	อนุกรรมการ
10.	ผู้แทนสมาคมเวชศาสตร์ชันสูตรทางสัตวแพทย์ไทย (นางสาวเจนนุช ว่องธวัชชัย)	อนุกรรมการ
11.	ผู้ทรงคุณวุฒิ และผู้เชี่ยวชาญ (เฉพาะคราวประชุม) (นางสุปราณี ชินบุตร นางสาวจิราพร เกษรจันทร์ นายวิศนุ บุญญาวิวัฒน์)	อนุกรรมการ

12. ผู้แทนสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (นางสาวดรุณี ทันตสุวรรณ) — อนุกรรมการและเลขานุการ

13. ผู้แทนสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (นายสมเกียรติ ศรีพิสุทธิ์) — อนุกรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้ง เป็นข้อกำหนดสำหรับให้การรับรองการปลอดโรคจุดขาวในกุ้ง และใช้เป็นคู่มือการชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้งในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีย้อมสีอย่างรวดเร็ว วิธีทางจุลพยาธิวิทยา และวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบเนสเต็ด 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. White spot disease., Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Chapter 4.1.2. World Organisation for Animal Health. Paris, France.

ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ : การชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้ง
พ.ศ. 2550

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

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

ประกาศ ณ วันที่ ๒๙ พฤษภาคม พ.ศ. 2550

(ศาสตราจารย์ ธีระ สูตะบุตร)
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ประธานกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
การชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้ง

1. ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ กำหนดรายละเอียดที่สำคัญเกี่ยวกับการชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้งทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว วิธีทางจุลพยาธิวิทยา และวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบเนสเต็ด

2. นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 กุ้ง (shrimp) หมายถึง สัตว์ในสกุล *Penaeus*

2.2 โรคจุดขาว (white spot disease, WSD) หมายถึง โรคที่เกิดในกุ้ง มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส (white spot syndrome virus, WSSV) โดยพบรอยโรค (lesion) เป็นจุดขาวหรือดวงขาวใต้เปลือกส่วนหัวและโคนหาง บางครั้งมีลักษณะตัวแดงร่วมด้วย และทำให้กุ้งตายได้

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 กุ้งที่มีรยางค์ (appendage) เหมือนกุ้งเต็มวัย มีขนาดประมาณ 5 mm และใช้เวลาเติบโตจากระยะไมซิสอีกประมาณ 25 วันหรือมากกว่า เพื่อเจริญเข้าสู่วัยรุ่น นิยมเขียนย่อว่า PL แล้วตามด้วยจำนวนวันหลังวัยอ่อน เช่น PL21 หมายถึง กุ้งหลังวัยอ่อนที่มีอายุ 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 ซึ่งทำหน้าที่เช่นเดียวกับกับเลือดและน้ำเหลืองในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

2.9 พาหะนำโรค (carrier) หมายถึง สัตว์มีเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค โดยไม่แสดงอาการป่วย

2.10 วิธีทดสอบเบื้องต้น (presumptive test) หมายถึง วิธีการตรวจโรคทางห้องปฏิบัติการที่สะดวกหรือรวดเร็ว เช่น วิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว วิธีทางจุลพยาธิวิทยา เป็นต้น

2.11 วิธีทดสอบยืนยัน (confirmation test) หมายถึง วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการยืนยันผลการชันสูตรโรค และเป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีความจำเพาะและความไวสูง

3. การชันสูตรโรค

การชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้งด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ เช่น การย้อมสีแบบรวดเร็ว วิธีทางจุลพยาธิวิทยา วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบเนสเต็ด *In-situ* hybridisation, Western blot analysis, dot blot analysis เมื่อได้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแล้ว สัตวแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญควรพิจารณา ประวัติทางวิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการป่วยของกุ้งร่วมด้วย (ภาคผนวก ก) เพื่อให้การรักษาป้องกันโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้วิธีการชันสูตรแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกัน (ภาคผนวก ข)

วิธีชันสูตรโรคจุดขาวเบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการที่แนะนำให้ใช้ในมาตรฐานนี้ คือ วิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว วิธีทางจุลพยาธิวิทยา กรณีที่ผลเป็นลบจะต้องทดสอบยืนยันด้วยวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบเนสเต็ด เนื่องจากมีความจำเพาะและความไวสูง ซึ่งการเลือกใช้วิธีชันสูตรโรคจุดขาวขึ้นกับวัตถุประสงค์และชนิดตัวอย่างที่เก็บ เช่น การตรวจรับรองพ่อแม่พันธุ์ก่อนเพาะฟัก และลูกกุ้งก่อนปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดิน หรือกุ้งที่สงสัยว่าติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ ควรใช้วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบเนสเต็ด กุ้งป่วยหรือกุ้งระยะที่เลี้ยงในบ่อดินสามารถใช้วิธีทางจุลพยาธิวิทยา หรือวิธีย้อมสีแบบรวดเร็วได้

3.1 การชักตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างที่ต้องสุ่มตรวจให้เป็นไปตามตารางที่ ค.1 (ภาคผนวก ค)

3.2 วิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว (rapid staining test)

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโรคในระดับเนื้อเยื่อ โดยย้อมเนื้อเยื่อสดด้วยสีฮีมาทอกซิลีนและอีโอซิน (hematoxylin and eosin, H&E) ในระยะเวลาสั้นๆ และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

วิธีนี้สามารถใช้ในการชันสูตรโรคจุดขาวได้เฉพาะกับกุ้งหลังวัยอ่อนขนาดใหญ่ (อายุมากกว่า PL30) เท่านั้น ไม่สามารถใช้กับลูกกุ้งหลังวัยอ่อน หรือกุ้งที่ไม่แสดงอาการป่วยได้ ตัวอย่างที่เหมาะสม คือ เหงือกของกุ้ง หรือเนื้อเยื่อใต้เปลือกส่วนหัว (carapace) ที่แสดงรอยโรค โดยขนาดของตัวอย่างเหงือกต้องยาวไม่เกิน 0.5 cm

3.2.2 วิธีการ

(1) ใส่สารละลายคงสภาพเดวิดสันผสมกรดเกลือ (HCl Davidson's fixative) (ภาคผนวก ง ข้อ ง.1.2) ปริมาตร 0.5 ml ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml ตัดชิ้นเหงือกจากกุ้งป่วยแช่ในสารละลายคงสภาพผสมกรดเกลือเดวิดสัน นาน 1 h หรือสามารถใช้ตัวอย่างซึ่งเก็บตามวิธีในข้อ 3.3.1

(2) เทสารละลายคงสภาพเดวิดสันผสมกรดเกลือทิ้ง นำผ้าก๊อซปิดที่ปากหลอดพลาสติก แล้วนำไปล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านเบาๆ นาน 15 min (ระวังชิ้นตัวอย่างไหลออกจากหลอด)

(3) เทน้ำออก แล้วหยดสีฮีมาทอกซิลีน 3 หยดลงในหลอด (ให้ท่วมชิ้นเหงือก) แช่ทิ้งไว้นาน 10 min

(4) เทสีออก แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านเบาๆ นาน 15 min

(5) เทน้ำออก หยดสีอีโอซิน 3 หยดลงในหลอด (ให้ท่วมชิ้นเหงือก) แช่ทิ้งไว้นาน 2 min

(6) เทสีออก เติมเอทานอล 50% ปริมาตร 0.5 ml ทิ้งไว้นาน 1 min แล้วเทออก

(7) เติมเอทานอล 70% ปริมาตร 0.5 ml นาน 1 min แล้วเทออก

(8) เติมเอทานอล 90% ปริมาตร 0.5 ml แช่ไว้นาน 1 min แล้วเทออก ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

(9) เติมเอทานอลสัมบูรณ์ (absolute ethanol) ปริมาตร 0.5 ml แช่ไว้นาน 1 min แล้วเทออก ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

(10) เติมไซลีน (xylene) ปริมาตร 0.5 ml แช่ไว้นาน 1 min แล้วเทออก ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เก็บเหงือกไว้ในไซลีน ระวังอย่าให้แห้ง

(11) ใช้ปากคีบ (forceps) หักชิ้นเหงือก (gill) เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปวางบนสไลด์ ใช้ปากคีบกดให้แตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ จนซี่เหงือก (primary gill lamella) แยกออกเป็นชิ้นเดี่ยวๆ ทำให้สามารถตรวจดูกิ่งเหงือก (secondary gill lamella) ได้สะดวก

(12) หยดเพอร์เมาท์ (permount) 1 หยด ใช้กระจกปิดสไลด์ปิด วางไว้นาน 3 min ถึง 5 min ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยาย 400 เท่า

3.2.3 การแปลผล

กุ้งที่ป่วยเป็นโรคจุดขาวจะพบอนุภาคฝังใน (inclusion) สีม่วงแดง ในนิวเคลียสที่ใหญ่กว่าปกติของเซลล์เยื่อบุใต้ผิวเหงือกกุ้ง (subcuticular epithelial cells) (รูปที่ จ.3 และ จ.4)

หมายเหตุ อาจลดเวลาที่ย้อมด้วยสีอีโอซิน ลงได้ตามขนาดของเนื้อเยื่อ

3.3 วิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological method)

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโรคในระดับเนื้อเยื่อ โดยย้อมเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการรักษาให้คงสภาพ ด้วยสี H&E และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

3.3.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

(1) นำกุ้งมีชีวิตแช่ในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน (Davidson's fixative) (ภาคผนวก ง ข้อ ง.1.1) ที่แช่เย็น และมีปริมาตรประมาณ 10 เท่าของปริมาตรกุ้ง โดย

(1.1) กุ้งวัยอ่อนระยะนอเพลียส ถึง PL20 สามารถเก็บรักษาสภาพทั้งตัวได้ในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน

(1.2) กุ้ง PL21 จนถึงกุ้งที่มีน้ำหนักไม่เกิน 3 g ให้รักษาสภาพทั้งตัวโดยแช่ในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน โดยเปิดเปลือกส่วนหัวตามแนวยาว เพื่อให้สารละลายเข้าไปที่ตับและตับอ่อน

(1.3) กุ้งที่มีน้ำหนักตั้งแต่ 3 g ขึ้นไป ให้ฉีดสารละลายคงสภาพเดวิดสันเข้าไปในช่องปากส่วนหัวด้านหลังใต้เปลือก ตับและตับอ่อนส่วนท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้าย และลำตัวทั้งด้านท้องและด้านหลังให้ทั่ว โดยใช้สารละลายคงสภาพเดวิดสันประมาณ 1 ml ถึง 10 ml ขึ้นอยู่กับขนาดกุ้ง ตัดเปลือกกุ้งตามแนวยาวตั้งแต่เปลือกช่วงท้องปล้องที่ 6 จนถึงส่วนหัว

(1.4) กุ้งที่มีน้ำหนักมากกว่า 12 g ให้ฉีดสารละลายคงสภาพเดวิดสันเข้าที่ส่วนหัว และส่วนลำตัวด้านท้อง จากหัวไปหางให้ทั่วตัว หลังจากนั้นให้ตัดกุ้งตามขวางบริเวณส่วนหัวและส่วนท้อง

(2) นำตัวอย่างตาม (1) แช่ในสารละลายคงสภาพเดวิดสันนาน 24 h ถึง 48 h ขึ้นอยู่กับขนาดของกุ้ง แล้วนำตัวอย่างมาแช่ในเอทานอล 70% เพื่อช่วยให้เก็บตัวอย่างได้นานขึ้น

3.3.2 วิธีการ

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.3.1 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 ^{o}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) ขจัดเอทานอล โดยแช่ในไซลีน

(6.9) หยดเพอร์เมาท์ (permount) 1 หยด แล้วปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์

(6.10) นำสไลด์เนื้อเยื่อมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

3.3.3 การแปลผล

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV จะพบพยาธิสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เจริญมาจากชั้นเอ็กโธเดิร์ม (ectoderm) และเมโซเดิร์ม (mesoderm) ที่สำคัญคือ นิวเคลียสใหญ่ขึ้นและติดสีแดงในระยะแรกของการติดเชื้อ และติดสีน้ำเงินในระยะหลัง บางครั้งโครมาตินจะถูกดันไปติดเยื่อหุ้มนิวเคลียส (รูปที่ จ.3)

3.4 วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบเนสเต็ด (nested polymerase chain reaction, nested PCR)

หลักการของวิธีนี้ คือ การเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ WSSV แบบทวีคูณ จนมีจำนวนมากพอที่จะตรวจพบได้ โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 2 ชุดในปฏิกิริยา

วิธีต่อไปนี้ดัดแปลงจาก Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals ของ OIE[1] (2003) โดยใช้วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบเนสเต็ด

3.4.1 การเก็บและรักษาตัวอย่าง

(1) นำตัวอย่างกุ้งมีชีวิตพร้อมน้ำจากบ่อเลี้ยงใส่ถุงพลาสติกหรือภาชนะอื่นที่เหมาะสม แยกตัวอย่างแต่ละบ่อไม่ปะปนกัน เขียนรายละเอียดให้ชัดเจน และขนส่งในสภาพมีชีวิตจนถึงห้องปฏิบัติการ

(2) ถ้าไม่สามารถนำตัวอย่างกุ้งมีชีวิตส่งตรวจได้ ให้นำตัวอย่างกุ้งใส่ถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท แช่น้ำแข็ง แล้วรีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันทีหรือภายใน 24 h หากไม่สามารถส่งตัวอย่างภายในวันนั้นได้ ให้แช่แข็งตัวอย่างกุ้งทั้งตัว (frozen whole specimens) ในน้ำแข็งแห้งหรือในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}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 โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากแอ่งเลือด (haemocoel) ที่ใต้ท้องบริเวณขาว่ายน้ำคู่แรก หรือบริเวณขาเดิน (periopod) คู่ที่ 3 ถึงคู่สุดท้าย (รูปที่ จ.2) หรือที่หัวใจ ด้วยเข็มและกระบอกฉีดยาที่มีสารละลายรักษาสภาพเลือด (ภาคผนวก ง ข้อ ง.1.3) ในปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเลือด แล้วแช่เย็นตัวอย่างเลือดกุ้งและนำส่งห้องปฏิบัติการ ภายใน 6 h ถึง 8 h หากไม่สามารถส่งตัวอย่างภายในเวลานั้นได้ ให้แช่แข็งตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งแห้ง หรือในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C หรือต่ำกว่า นำตัวอย่างแช่แข็งใส่ในกล่องเก็บความเย็นที่มีน้ำแข็ง แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 24 h

(5) ถ้าต้องการเก็บรักษาตัวอย่างเป็นเวลานาน ให้เก็บเลือดใส่ใน lysis solution (ภาคผนวก ง ข้อ ง.2.1) ในอัตราส่วนของเลือดต่อ lysis solution เป็น 1:2 หรือนำอวัยวะกุ้ง เช่น ขาว่ายน้ำ ก้านตาที่ตัดลูกตาออกแล้ว เหงือก หรือลูกกุ้งที่มีอายุน้อยกว่า PL16 ทั้งตัว บดใน storage lysis buffer (ภาคผนวก ง ข้อ ง.2.2) จะสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานกว่า 1 ปี

---

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

3.4.2 วิธีการ

(1) การสกัด DNA เป้าหมายจากตัวอย่าง

(1.1) การเตรียมตัวอย่าง ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง คือ

(1.1.1) ถ้าเป็นกุ้งวัยรุ่นจนถึงก่อนโตเต็มวัย ให้เก็บตัวอย่างกุ้งตามจำนวนที่ระบุในภาคผนวก ค ตารางที่ ค.1 มาบดให้ละเอียด แล้วนำตัวอย่างที่บดแล้ว 100 mg ถึง 200 mg เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

(1.1.2) ถ้าเป็นกุ้งอายุต่ำกว่า PL15 ให้ใช้ทั้งตัว

(1.1.3) ถ้าเป็นกุ้ง PL16 ถึง PL20 ใช้ทั้งตัว แต่ต้องตัดตาออกก่อน เนื่องจากตาของกุ้งมีสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสแบบเนสเต็ด

(1.1.4) ถ้าเป็นเลือด ให้เก็บตามวิธีในข้อ (4) ของข้อ 3.4.1

(1.2) ใส่ตัวอย่างกุ้งในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ปริมาตร 1.5 ml ตามด้วย lysis solution (ภาคผนวก ง ข้อ ง.2.1) 600 µl บดตัวอย่างให้ละเอียด แล้วบ่มที่ 65 °C นาน 1 h

หมายเหตุ ในกรณีที่เก็บตัวอย่างเลือดใน lysis solution ตามข้อ 3.4.1 (5) ให้ใช้ตัวอย่าง 800 µl แล้วดำเนินการในข้อ (1.3) ต่อไป

(1.3) เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5 mol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ NaCl ในสารประกอบเป็น 0.7 mol

(1.4) ค่อย ๆ เติม N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide (CTAB) 10% ที่ละลายอยู่ใน NaCl 0.7 mol ในสัดส่วน 1:10 ของปริมาตรตัวอย่างในข้อ (1.4) แล้วผสมให้เข้ากัน

(1.5) บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 min แล้วนำออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง

(1.6) เติมคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform/isoamyl alcohol) ที่ผสมในอัตราส่วน 24:1 ในปริมาตรเท่ากันกับตัวอย่างที่ได้จากข้อ (5) ของข้อ 3.4.1 ผสมให้เข้ากันเบา ๆ

(1.7) ปั่นเหวี่ยงที่ 13 000 *g* นาน 5 min แล้วดูดเอาสารละลายส่วนใส (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่

(1.8) เติมฟีนอล (phenol) ปริมาตรเท่ากันกับตัวอย่าง เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

(1.9) ปั่นเหวี่ยงที่ 13 000 *g* นาน 5 min แล้วดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ถ้าต้องการให้ได้ DNA ที่บริสุทธิ์มากขึ้น ให้สกัดซ้ำด้วยฟีนอลอีก 1 ครั้ง ถึง 2 ครั้ง

(1.10) นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ผสมกับคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 2 เท่า ผสมเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13 000 *g* นาน 5 min

(1.11) นำสารละลายส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วตกตะกอน DNA ด้วยเอทานอล 95% ปริมาตร 2 เท่าของตัวอย่าง แล้วเก็บที่ -20 °C นาน 30 min หรือที่ -80 °C นาน 15 min

(1.12) ปั่นเหวี่ยงที่ 13 000 *g* นาน 30 min เทเอทานอลทิ้งไป แล้วล้างตะกอน DNA ด้วยเอทานอล 70% วางทิ้งไว้ให้เอทานอลระเหยจนหมด

(1.13) ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 100 µl บ่มที่ 65 °C นาน 15 min (น้ำกลั่นที่ใช้ต้องปลอดเชื้อและผ่านการกลั่นอย่างน้อยสองครั้ง)

(1.14) เก็บรักษาสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้

(2) การเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายในขั้นตอนที่ 1

(2.1) เตรียมสารผสม PCR cocktail ปริมาตร 100 µl ซึ่งประกอบด้วย Tris/HCl 10 mmol pH 8.8, KCl 50 mmol, $MgCl_2$ 1.5 mmol, Triton X-100 0.1%, 200 µmol ของแต่ละ dNTP, 100 pmol ของแต่ละไพรเมอร์ รหัส 146 F1 และ 146 R1 (ตารางที่ 1) และ DNA polymerase 2 units

ตารางที่ 1. แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ (neucleotide) ของไพรเมอร์ รหัส 146 F1 และ 146 R1

Primer	Sequence
146 F1	5′-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCT-AG-3′
146 R1	5′-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3′

(2.2) เติมตัวอย่าง DNA ปริมาตร 1 µl (มี DNA อยู่ประมาณ 0.1 µg ถึง 0.3 µg) ลงในหลอดที่มีสารผสมอยู่ ในการชันสูตรทุกครั้งต้องมีชุดควบคุมทั้งที่เป็น positive control, negative control และ blank (non-template control)

(2.3) นำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรม 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 4 min ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 1 min และที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 2 min แล้วตามด้วยโปรแกรม 39 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 min ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 1 min ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 2 min และรอบสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 min

(3) การเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายในขั้นตอนที่ 2

(3.1) ดูด PCR product ที่ได้จากข้อ (2.3) มา 10 µl ใส่ในหลอดสารผสม PCR cocktail 90 µl ซึ่งมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ (2.1) แต่เปลี่ยนไพรเมอร์ เป็น 146 F2 และ 146 R2 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2. แสดงลำดับนิวคลิโอไทด์ของไพรเมอร์ รหัส 146 F2 และ 146 R2

Primer	Sequence
146 F2	5′-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3′
146 R2	5′-TAC-GGC-AGC -TGC-TGC-ACC-TTG-T-3′

(3.2) ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ (2.3)

(4) แยกแถบ DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังนี้

(4.1) ผสมสีย้อม (6X loading dye) 2 µl กับ PCR product ที่ได้ เติมประมาณ 10 µl ลงในหลุมของ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1% ถึง 1.5%

(4.2) แยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า ในสารละลาย TBE (Tris, boric acid, EDTA)

(4.3) แล้วนำไปย้อมด้วย ethidium bromide (0.5 µg/ml) หรือใช้สารย้อม DNA ชนิดอื่น

(4.4) ใช้ DNA ladder ขนาด 100 bp เป็น marker

3.4.3 การแปลผล

- เมื่อพบแถบ DNA ขนาด 941 bp (base pair) ให้อ่านผลเป็นบวก เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control อาจพบแถบ DNA ขนาด 1 447 bp ร่วมด้วย
- เมื่อไม่พบแถบ DNA ขนาด 941 bp ให้อ่านผลเป็นลบ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative controls
- ความไวของวิธีทดสอบนี้ คือ สามารถพบ PCR product ได้ เมื่อมีปริมาณ DNA เป้าหมายในตัวอย่างมีมากกว่า 20 copies ขึ้นไป

หมายเหตุ อาจใช้วิธีการทดสอบปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรสอื่นแทน หากมีความไวและความจำเพาะที่เทียบเท่าหรือดีกว่า และได้รับการเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ

ภาคผนวก ก
วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคจุดขาว

ก.1 วิทยาการระบาด

โรคจุดขาวหรือเรียกว่าโรคตัวแดงดวงขาว เป็นโรคระบาดที่อยู่ในบัญชีโรคสัตว์น้ำขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ และอยู่ในกฎกระทรวง พ.ศ. 2548 ภายใต้พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 โรคนี้เกิดจากกุ้งติดเชื้อ WSSV ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่ (dsDNA) ขนาด 305 kbp อยู่ในวงศ์ Nimaviridae สกุล *Whispovirus* ไวรัสมีรูปร่างเป็นแท่งจนถึงรูปไข่ ขนาด 80 nm ถึง 120 nm x 250 nm ถึง 380 nm มีผนังหุ้ม (envelope) มีรายงานการตรวจพบโรคนี้ในกุ้ง *Penaeus monodon* (กุ้งกุลาดำ), *P. vannamei* (กุ้งขาว), *P japonicus*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. merguiensis*, *P. setiferus* และ *P. stylirostris* นอกจากนี้ยังพบได้ในปูหลายชนิด จากการทดลองพบว่าเชื้อ WSSV สามารถทำให้กุ้ง *P. articus*, *P. duodarum* และ *P. setiferus* ตายได้

การระบาดของโรคจุดขาวมีรายงานเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2536 ในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง *P. japonicus* แห่งหนึ่ง ที่ประเทศญี่ปุ่น หลังจากนั้นโรคได้แพร่ระบาดไปยังประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย ได้แก่ จีน เกาหลีใต้ อินเดีย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น รวมทั้งประเทศในทวีปอเมริกา โดยเรียกชื่อไวรัสนี้แตกต่างกันไป สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบโรคจุดขาวครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2537 ที่ จ. ตรัง และเรียกไวรัสนี้ว่า systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV)

ก.2 พยาธิกำเนิด

เมื่อกุ้งติดเชื้อ WSSV เชื้อจะทำลายเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดจากเอ็กโทเดิร์มและเมโซเดิร์ม เช่น เยื่อบุผิวชั้นใต้เปลือก (cuticular epithelium) เยื่อบุทางเดินอาหาร เหงือก หัวใจ เนื้อเยื่อประสาท กล้ามเนื้อ และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด ทำให้นิวเคลียสใหญ่ (hypertrophied nuclei) จนเต็มหรือเกือบเต็มเซลล์ ที่เรียกว่า Cowdry type A inclusion

กุ้งสามารถติดโรคจุดขาวได้โดยตรงจากกุ้งแม่พันธุ์โดยถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่ นอกจากนี้กุ้งยังสามารถติดเชื้อ WSSV ที่แพร่มากับน้ำในบ่อเลี้ยง หรือกุ้งที่แข็งแรงกินกุ้งที่ติดเชื้อ (cannibalism) เข้าไป โรคนี้ติดต่อทางอ้อมได้โดยผ่านสัตว์พวกกุ้ง กั้ง ปู (crustacean) มากกว่า 40 ชนิด แม้ว่าขณะนี้ยังไม่มีรายงานที่แสดงกลไกการแพร่เชื้อที่ชัดเจน แต่พบว่ากุ้งปกติสามารถติดเชื้อจากกุ้งป่วยที่อยู่ร่วมกันได้ ภายใน 36 h ถึง 48 h และจากสื่อนำโรคเชิงกล (mechanical vector) ที่นำเชื้อได้

ก.3 อาการ

อาการที่พบในกุ้งติดเชื้อ WSSV จะแตกต่างกันไป ขึ้นกับอายุกุ้งและการจัดการฟาร์ม อย่างไรก็ดีความรุนแรงของการระบาดจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดอื่นๆ ด้วย เช่น คุณภาพน้ำไม่เหมาะสม กุ้งป่วยจะว่ายใกล้ผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อ หากเปิดเปลือกส่วนหัวออกดูจะสังเกตเห็นจุดขาวได้ง่าย หลังจากเริ่มแสดงอาการแล้วกุ้งจะตายอย่างรวดเร็วภายในไม่กี่วัน อย่างไรก็ตาม จุดขาวที่เปลือกอาจเกิดจากสาเหตุอื่นได้ เช่น น้ำในบ่อมีความเป็นด่างสูง เชื้อแบคทีเรีย และสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป อาการป่วยมักพบในกุ้งระยะวัยรุ่นที่ติดเชื้อ ซึ่งมีได้ 3 แบบ คือ

ก.3.1 แบบเฉียบพลัน

กุ้งที่ติดเชื้อจะป่วยและตายอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน ถึง 5 วัน หลังจากเริ่มแสดงอาการ อัตราการตายสะสมระหว่าง 80% ถึง 100% มีรอยโรคจุดขาวหรือดวงขาว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm ถึง 2 mm ที่ในเปลือก (รูปที่ จ.1) กุ้งอาจมีสีชมพูถึงแดง ไม่กินอาหาร ว่ายน้ำเชื่องช้า มักอยู่ใกล้ผิวน้ำหรือเกาะที่ขอบบ่อ

ก.3.2 แบบกึ่งเฉียบพลัน

กุ้งที่ติดเชื้อจะทยอยป่วยและตายไปเรื่อยๆ มีระยะเวลาไม่แน่นอน ทั้งนี้ขึ้นกับคุณภาพน้ำและการจัดการฟาร์ม กุ้งอาจมีหรือไม่มีรอยโรคเป็นจุดขาว กินอาหารลดลง เคลื่อนไหวเชื่องช้า มีอัตราการตายสะสม 30% ถึง 80% ตลอดระยะเวลาที่เลี้ยง

ก.3.3 แบบเรื้อรัง

กุ้งที่ติดเชื้ออาจมีหรือไม่มีรอยโรคเป็นจุดขาว และไม่ตาย

ภาคผนวก ข
การเปรียบเทียบความแม่นยำของวิธีการชันสูตรโรค

ตารางที่ ข.1 เปรียบเทียบความแม่นยำการชันสูตรโรคจุดขาวด้วยวิธีต่าง ๆ[1]

วิธีชันสูตร	แบบคัดกรอง (Screening)				แบบเบื้องต้น	แบบยืนยันโรค
	กุ้งวัยอ่อน	กุ้งหลังวัยอ่อน	กุ้งวัยรุ่น	กุ้งโตเต็มวัย		
ด้วยตาเปล่า (Gross signs)	–	–	–	–	+	–
กล้องจุลทรรศน์ (Direct DF/LM)[1]	–	–	–	–	+	+
จุลพยาธิวิทยา	–	–	–	–	++	++
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องผ่าน (TEM)	–	–	–	–	+++	+++
อิไลซา (ELISA)	n/a	n/a	+++	+++	+++	+++
หัวตรวจดีเอนเออินซิตู (DNA probes-*in situ*)	n/a	n/a	+	+	+++	+++
Nested PCR	+++	+++	+++	+++	+++	+++

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

n/a = ไม่มีข้อมูล (not available)
– = ไม่มีวิธีการทดสอบหรือเป็นวิธีที่ยังไม่เหมาะสม
+ = วิธีที่ใช้ได้ในบางกรณี เนื่องจากมีข้อจำกัดบางประการ
++ = วิธีมาตรฐาน ใช้กันทั่วไป มีประสิทธิภาพดีและมีความจำเพาะ
+++ = วิธีที่แนะนำให้ใช้ เนื่องจากมีความจำเพาะและความไวสูง
DF/LM = dark field/light microscope

ภาคผนวก ค
การชักตัวอย่าง

ตารางที่ ค.1 แผนการชักตัวอย่าง[1]

ขนาดรุ่น	จำนวนตัวอย่าง เมื่อคาดว่ามีความชุกโรคที่			
	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 หรือมากกว่า	299	150	60	30

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

หมายเหตุ

จำนวนตัวอย่างกุ้งที่ต้องสุ่มตรวจ (size of sample) ขึ้นอยู่กับความชุกโรคจุดขาวที่คาดว่ามี (prevalence) และขนาดรุ่น(lot size) หรือจำนวนกุ้งที่มีในบ่อ

1) ในการตรวจกุ้งระยะ PL ต้องใช้จำนวนตัวอย่างที่ความชุกโรค 1% ถึงความชุกโรค 2% โดยสุ่มกุ้งมีชีวิตมาจาก 5 ตำแหน่งให้ครอบคลุมพื้นที่ทั้งบ่อ หากเป็นพ่อแม่พันธุ์ให้ตรวจทุกตัวหรือตรวจที่ความชุกโรค 5% ในกรณีกุ้งวัยรุ่นให้ใช้จำนวนตัวอย่างที่ความชุกโรค 2% ถึงความชุกโรค 10%

2) วิธีการแปลผล
   - ถ้าผลการตรวจเป็นบวก หมายความว่า มีกุ้งติดเชื้อ 2% หรือมากกว่า ในกลุ่มประชากรตัวอย่าง
   - ถ้าผลการตรวจเป็นลบ หมายความว่า มีกุ้งติดเชื้อต่ำกว่า 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	335	ml

ง.1.2 สารละลายคงสภาพเดวิดสันผสมกรดเกลือ ปริมาตร 1 000 ml

absolute ethanol	330	ml
40% formalin	220	ml
50% conc. HCl	115	ml
distilled water	335	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 เติมกลูโคสความเข้มข้น 1 mol 100 ml
(โดยชั่งกลูโคส 36 g ละลายในน้ำกลั่น 200 ml)
– เติมน้ำให้ครบ 1 000 ml

ง.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในวิธี nested PCR

ง.2.1 lysis solution มีความเข้มข้นของสารเคมีต่าง ๆดังนี้

100 mmol NaCl

10 mmol Tris/HCl pH 8

25 mmol EDTA

0.5% SLS (sodium N-laurylsarcosinate) หรือ 2% SDS (sodium dodecyl sulfate)

0.5 mg/ml proteinase K

หมายเหตุ ให้เตรียม proteinase K ใหม่ทุกครั้งก่อนนำไปใช้

ง.2.2 storage lysis buffer

50 mmol NaCl

50 mmol Tris/HCl pH 9

100 mmol EDTA

2% SDS

1 mg/ml proteinase K

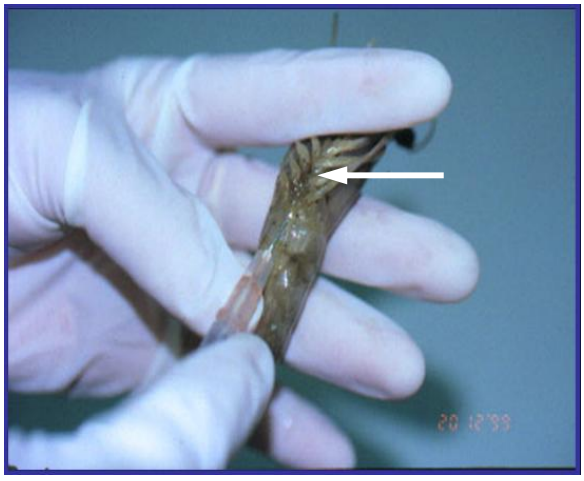
หมายเหตุ ให้เตรียม proteinase K ใหม่ทุกครั้งก่อนนำไปใช้

ภาคผนวก จ
ภาพประกอบการชันสูตรโรคจุดขาว

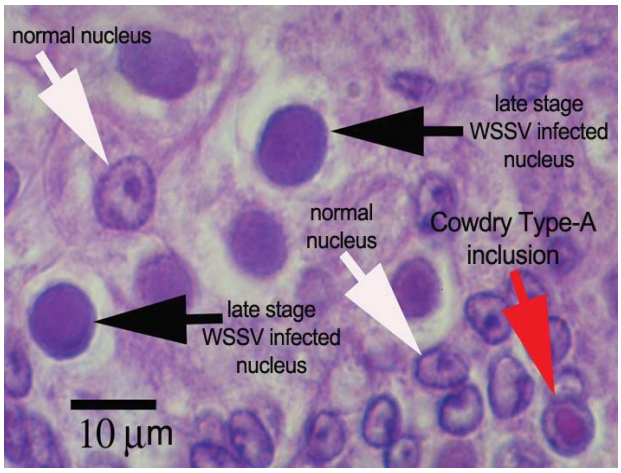
(a)

(b)

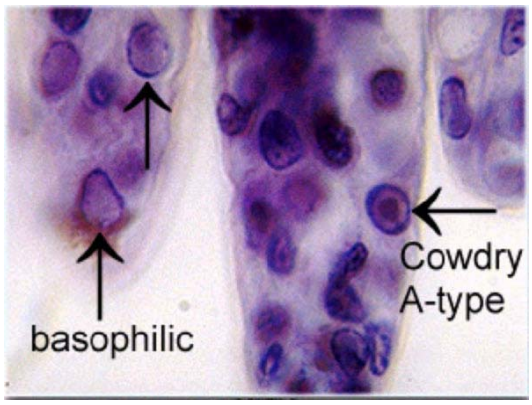
รูปที่ จ.1 แสดงรอยโรคของโรคจุดขาวในกุ้งกุลาดำ ลำตัวกุ้งมีสีแดง มีดวงขาวที่เปลือก ส่วนหัว (a) และลำตัว (b) (เอื้อเฟื้อภาพโดย ดร. จิราพร เกษรจันทร์)



รูปที่ จ.2 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือด (haemolymph) จากแอ่งเลือดใต้ท้องบริเวณขาว่ายน้ำคู่แรก (ventral sinus) หรือจากแอ่งเลือดใต้ท้องบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้าย (cardiac sinus) (ลูกศร) (เอื้อเฟื้อภาพโดย รศ. สพ.ญ. ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย)



รูปที่ จ.3 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคจุดขาว นิวเคลียสของเซลล์ปกติ (หัวลูกศรสีขาว) เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ (hypertrophied nuclei) ติดสีแดงในระยะแรกเรียก Cowdry type A inclusion (หัวลูกศรสีแดง) แล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินในระยะหลัง (หัวลูกศรสีดำ) (H&E stain) (เอื้อเฟื้อภาพโดย Dr. Timothy W. Flegel)



รูปที่ จ.4 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคจุดขาวที่เหงือกจากวิธีย้อมสีแบบรวดเร็ว เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสระยะแรกจะมีนิวเคลียสขยายใหญ่ (hypertrophied nuclei) ติดสีแดงเรียก Cowdry type A inclusion และระยะหลังนิวเคลียสติดสีน้ำเงิน (basophilic) (เอื้อเฟื้อภาพโดย Dr. Timothy W. Flegel)

ภาคผนวก ช

หน่วย

หน่วยและสัญญลักษณ์ที่ใช้ในมาตรฐานฯ 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