บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

ไวรัสหัวเหลือง หรือ yellow – head virus (YHV) เป็นไวรัสสำคัญชนิดหนึ่งที่ก่อโรคเกิดการระบาดในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* และทำความเสียหายต่ออุตสาหกรรมกุ้งในประเทศไทยเป็นอย่างมากในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากการแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว และมีความรุนแรง อีกทั้งยังไม่มีวิธีใด ๆ ที่จะนำมารักษาโรคดังกล่าวนี้ได้ ขณะนี้จึงมีแค่เพียงการป้องกันเฝ้าระวังไม่ให้เชื้อไวรัสเข้ามาสู่ระบบการเลี้ยงกุ้งเท่านั้นที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว การกำจัดพาหะนำโรคไวรัสนั้นถือเป็นหนทางหนึ่งที่สามารถป้องกันการระบาดของเชื้อไวรัส ซึ่งปูเป็นสัตว์ที่มีแนวโน้มในการเป็นพาหะนำโรคสูง การวิจัยดังต่อไปนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาถึงความสามารถในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อปู โดยเฉพาะอย่างยิ่งได้คัดเลือกนำปูชนิดที่พบอาศัยตามบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งมาตรวจสอบ เพื่อนำข้อมูลจากการพิสูจน์นี้เผยแพร่ต่อไปยังเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งได้ว่าปูชนิดใดบ้างที่เสี่ยงต่อการมีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลือง เพื่อที่จะได้หาหนทางกำจัดพาหะนำโรคดังกล่าวออกจากบริเวณที่เลี้ยงกุ้งได้ต่อไป

ตั้งแต่ประเทศไทยมีการระบาดของโรคหัวเหลืองติดต่อกันรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ ได้มีผู้วิจัยคิดค้นหาวิธีการตรวจสอบโรค เพื่อที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบสุขภาพของกุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์และกุ้งที่กำลังเลี้ยงอยู่เพื่อให้มั่นใจว่าเป็นกุ้งที่กำลังเลี้ยงอยู่นั้นเป็นกุ้งที่ปลอดเชื้อไวรัส โดยได้พัฒนาประสิทธิภาพให้ทราบผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และง่ายต่อการปฏิบัติมากขึ้นเป็นลำดับ ในระยะแรก ๆ วิธีที่เริ่มนำมาใช้ได้แก่การตรวจสอบอาการของโรคและวิธีการดูเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อทาง histology (Flegel et al.,1977) ซึ่งวิธีดังกล่าวไม่สามารถตรวจสอบได้ในกุ้งที่ติดเชื้อในระยะแรกและกุ้งที่ยังไม่เกิดอาการ และอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งได้แก่วิธี RT – PCR เนื่องจากมีความไวในการตรวจสอบสอบสูง สามารถตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในปริมาณ RNA ของเชื้อไวรัส เพียงแค่ 0.01 พิโคกรัม ในกุ้งกุลาดำที่เพิ่งได้รับเชื้อหลังการฉีดเหนี่ยวนำในเวลาเพียงแค่ 6 – 12 ชั่วโมง (Chainarong Wongteerapaya et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีวิธีของ in *situ* hybridization โดยใช้ cDNA ที่ติดฉลากด้วย dioxigenin เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้ง *Penaeus vannamei* (Tang and Lightner, 1999) ทั้งสองวิธีเป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจไวรัสสูง แต่ในแง่ของการนำไปปฏิบัติใช้นั้นยังไม่แพร่หลายเนื่องจากยังต้องใช้เครื่องมือเฉพาะและบุคลากรที่มีความรู้ รวมไปถึงมีค่าใช้จ่ายที่สูงเกินไปสำหรับการตรวจในตัวอย่างเพียงเล็กน้อย

การวิจัยดังต่อไปนี้จึงได้เลือกนำเทคนิคทางอิมมูนมาใช้ เนื่องจากมีความจำเพาะ มีความไวสูง สามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว และราคาต่ำ ซึ่งวิธีที่นำมาใช้ คือ วิธีของ indirect peroxidase immunohistochemistry หลังจากนั้นจึงทำการยืนยันผลการตรวจสอบด้วยวิธีของ one step RT-PCR

2.2 โรคหัวเหลือง

2.2.1 ชื่อและเชื้อที่ก่อโรค

Yellow-head disease , YH disease หรือ YHD of *P. monodon*

Yellow-head virus (YHV)

ในระยะแรก นักวิจัยในประเทศไทยรายงานถึงเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็น Type B cytoplasmic granulosis baculovirus หรือ baculo-like virus จึงให้ชื่อว่า "yellow head baculovirus"

2.2.2 ลักษณะสัณฐานวิทยา

วงศ์ : *Rhabdoviridae*

ปัจจุบัน จัดอยู่ใน จำพวก nidovirus ,order *Nidovirales*

(Nusra Sittidilokratna et al.,2002)

โครงสร้าง : รูปร่างแท่ง(rod shape) ภายในประกอบด้วย Helical Nucleocapsid ล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้ม envelope มีปุ่มปมหนาม โดยรอบ

ขนาด : 150 – 200 x 40 – 60 นาโนเมตร

กรดนิวคลีอิค : RNA สายเดี่ยว (Single – stranded RNA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประกอบด้วยโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 170 135 67

และ 22 กิโลดาลตัน

การจำลองตัว : เกิดขึ้นในไซโตพลาสม

ชนิดของ Host : กุ้งกุลาดำ *P. monodon*

Host ชนิดอื่น : *P. vannamei, P. setiferus, P. aztecus* และ *P. duorarum*

(Loh et al., 1997)

โรคหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำระบาดขึ้นในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2533 ในบริเวณส่วนของภาคกลาง และภาคตะวันออก โดยทำความเสียหายมากยิ่งขึ้นในปี 2534 หลังจากนั้นเริ่มระบาดเข้าสู่พื้นที่ทางภาคใต้เมื่อเดือน กุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2535 ที่อำเภอปากพนัง จังหวัดสงขลา และแพร่กระจายไปยังอำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี (สิทธิ บุณยรัตผลิน, 2535) ปัญหาการระบาดที่เกิดขึ้นนี้ สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งทั้งรายใหญ่และรายย่อยเป็นจำนวนมาก ไม่เฉพาะแต่ประเทศไทยเท่านั้นที่เกิดปัญหาการระบาดของโรค แต่ยังสร้างความเสียหายไปยังประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เช่น ไต้หวัน อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ แถบตะวันตกและประเทศฮาวายอีกด้วย

2.2.3 ลักษณะอาการ

กุ้งที่เป็นโรคหัวเหลืองจะพบในช่วงอายุประมาณ 1 เดือนจนถึง 4 เดือน แต่จะพบมากในช่วงที่กุ้งมีอายุ 40 – 90 วัน (สิทธิ บุณยรัตผลิน, 2356) การกินอาหารจะมากกว่าปกติในช่วงเริ่มต้นติดต่อกันหลายวัน หลังจากนั้นจะกินอาหารลดลงหรือไม่กินอาหารเลย กุ้งว่ายน้ำเกยบ่อและเกิดการตายอย่างต่อเนื่อง พบบริเวณส่วนหัว ตับและตับอ่อนบวมโตมีสีเหลืองอย่างชัดเจน การทำลายของไวรัสจะทำให้นิวเคลียสหดเล็กลง ต่อมาจะเกิดการแตกสลายของนิวเคลียส กุ้งมีการตายอย่างรวดเร็วและหมดบ่อภายใน 3 – 5 วัน โดยการระบาดของโรคนี้พบมากในช่วงรอยต่อของฤดู แต่ที่มีการระบาดหนักจะเป็นช่วงที่เข้าสู่ฤดูหนาวซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากพฤติกรรมกุ้ง เมื่ออากาศเย็นลงกุ้งจะชอบหมกในกองเลนซึ่งเป็นแหล่งสะสมของของเสียและเชื้อโรคต่างๆ มากมาย ดังนั้นโอกาสที่กุ้งจะติดเชื้อโปรโตซัวหรือแบคทีเรียมีสูง และไวรัสจึงเป็นสิ่งที่สร้างปัญหาความ

เสียหายตามมาได้ แต่ปัจจุบันแม้แต่หน้าร้อนตอนนี้ก็ยังพบการระบาดของไวรัสชนิดนี้ได้เหมือนกัน

2.2.4 การรักษาและป้องกัน

เชื้อไวรัสหัวเหลืองยังไม่มียาหรือสารเคมีที่ใช้ในการรักษาได้ผลสำเร็จ แต่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้โดยการจัดการคุณภาพน้ำและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสม (พายัพ ปักรังษี, บรรณาธิการ, 2544 : 104)

2.3 ลักษณะและชนิดของปูกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มประชากรตัวอย่างที่นำมาศึกษา เป็นปูในวงศ์ Grapsidae 5 ชนิด ได้แก่ *Varuna literata* , *Sesarma mederi* , *Sesarma moeschii* , *Sesarma polita* และ *Sesarma bocourti*

ทั้งหมดจัดอยู่ใน Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Order Decapoda

Family Grapsidae

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.1 ลักษณะของปูในวงศ์ Grapsidae

กระดองมีลักษณะกลมโค้งหรือคล้ายรูปสามเหลี่ยม front กว้าง เบ้าตาอยู่ตรงขอบด้านหน้าของมุมกระดองด้านนอก แผ่นกั้นระหว่างหนวดคู่ที่ 1 มีลักษณะกว้าง maxilliped คู่ที่ 3 มี palp อยู่ตรงกลางหรือตรงขอบด้านนอกของ merus ส่วนของ exognath มีลักษณะกว้างหรือยาวเรียว ช่องว่างระหว่าง maxilliped คู่ที่ 3 เป็นรูปสามเหลี่ยมขนมเปียกปูน ก้ามหนีบและขาเดินแข็งแรง ส่วนท้องของตัวผู้อาจแผ่ขยายเต็มหรือไม่เต็มช่องว่างระหว่างขาเดินคู่สุดท้าย ช่องเปิดเพศผู้อยู่บน ปล้องอก

2.3.2 ชนิดของปูในวงศ์ Grapsidae

2.3.2.1. *Varuna literata*

จัดอยู่ใน Subfamily Varuninae

Genus Varuna

Species literata (Alcock, 1900)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัย การแพร่กระจายมีดังนี้ (สุพจน์ แสงมณี, 2530)

ชื่อสามัญ ปูจาก ปูแป้น ปูลอยแพ

ลักษณะเด่น

ร่องของ carvical ลึก โดยเฉพาะตรงกลางกระดองมีลักษณะเป็นรูปตัว H บนบริเวณ branchial มีสันเฉียง 1 แถวเด่นชัดมาก บริเวณขอบตาด้านบนมีรอยแยก 1 แห่ง ขอบตาใน carpus ของก้ามมีแง่ยื่นไปข้างหน้า 1 อัน propodus และ dactylus ของขาเดินแบนและแผ่ขยายออก

ลักษณะทั่วไป

กระดองมีลักษณะเป็นรูปโค้งกลมค่อนข้างแบน มีความกว้างมากกว่าความยาวและมีพื้นผิวเรียบ ส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านใน มีลักษณะลาดและกว้าง แต่ไม่แบ่งออกเป็นลอน บริเวณต่าง ๆ บนกระดองไม่ชัดเจน ร่องของ cervical ลึก โดยเฉพาะตรงกลางมีลักษณะเป็นรูปตัว H บนบริเวณ branchial มีสันเฉียง 1 แถวเด่นชัดมาก ขอบด้านข้างของกระดองโค้งและมีรอยหยักเป็นแง่ยื่น 2 อัน ขอบด้านหน้าเกือบเป็นเส้นตรง เบ้าตามีขนาดเล็ก ตรง ขอบด้านบนมีรอยแยก 1 แห่ง

ก้ามของตัวอ่อนมีขนาดเล็กกว่าก้ามตัวแก่มาก ขอบด้านใน merus มีลักษณะหยักเป็นฟันเลื่อยขนาดเล็กและมีขนเป็นแถบยาวเรียงกันเป็นแถว ขอบด้านใน carpus มีแง่ยื่นลักษณะกลมตรงไปข้างหน้า 1 อัน ถัดจากแง่นี้ลงไปด้านล่างจะมีแง่ยื่นขนาดเล็กอีก 1 อัน พื้นผิวด้านบนของ carpus เรียบ พื้นผิวทุกด้านของ propodus เรียบ ส่วนบริเวณด้านนอกมีสันตามยาว

ประกอบด้วยเม็ดเล็ก ๆ เรียงตัวกันเป็นแถว 1 แถว ยาวตลอดไปจนถึงส่วนปลายทางด้านล่าง dactylus ยาวเรียวมีปลายแหลม

ขาเดินคู่แรกมีขนาดสั้นที่สุด คู่ที่ 3 ยาวที่สุดและยาวใกล้เคียงกับคู่ที่ 2 ขอบด้านหน้า merus ของขาเดินทุกคู่ใกล้กับส่วนปลายมีแง่แหลมคมยื่นออกมา 1 อัน ส่วนขอบด้านหลังเรียบและมีขนเป็นแถบยาวเรียงกันเป็นแถว merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวเป็น 3 เท่าของความกว้าง propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีลักษณะแบนและแผ่ขยายออก ตรงขอบด้านหน้าและด้านหลังมีขนเป็นแถบยาวเรียงกัน ขอบด้านหน้าของ dactylus มีความยาวมากกว่า propodus

ส่วนท้องของตัวผู้เป็นรูปสามเหลี่ยมยาวเรียว ปล้องแรกแผ่ขยายไม่เต็มช่องว่างระหว่างขาเดินคู่สุดท้าย ปล้องที่ 6 มีความกว้างประมาณ 1.5 เท่าของความยาว ปล้องสุดท้ายมีความยาวมากกว่าความกว้าง

อวัยวะเพศผู้มีลักษณะเป็นแท่ง 2 แท่งประกบกัน ส่วนปลายมนโค้งมีกลุ่มขนปกคลุมอยู่เป็นกระจุก

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลปนเหลืองอ่อน ก้ามหนีบมีสีเหลืองอ่อน บริเวณ gastric และบริเวณ branchial มีจุดเล็ก ๆ สีเหลือง 3 ถึง 4 จุด

ถิ่นอาศัย

พบอาศัยอยู่ใต้รากไม้ริมคลอง ว่ายน้ำหรือเกาะกอหญ้าลอยตามน้ำในลำคลอง แม่น้ำ บริเวณป่าชายเลน มักพบเฉพาะในช่วงฤดูฝนเท่านั้น

การแพร่กระจาย

ตราด จันทบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา ปัตตานี นราธิวาส ฝั่งทะเลอันดามันจากอัฟริกาถึงนิวซีแลนด์ จากออสเตรเลียถึงญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ เกาะมินดาเนา ชายฝั่งทางเหนือของนิวกินี มหาสมุทรอินเดีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.2.2 *Sesarma mederi*

จัดอยู่ใน

Subfamily	Sesarminae	
Genus	Sesarma	
Subgenus	Sesarma	
Species	mederi	(H. Milne Edwards, 1853)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัย การแพร่กระจายมีดังนี้ (สุพจน์ แสงมณี, 2530)

ชื่อสามัญ ปูแสม ปูก้ามแดง

ลักษณะเด่น

ผิวบน propodus ของก้ามมีสันยาวตามแบบ pectinate 1 แถว พบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย ส่วนพื้นผิวด้านในมีสันตามขวางประกอบด้วยเม็ดเล็ก ๆ เรียงกันเป็นแถว นูนขึ้นมาเด่นชัด ขอบด้านบน dactylus ของก้ามหนีบมีปุ่มลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดเท่า ๆ กันเรียงเป็นแถวตามความยาวจำนวน 40 ถึง 60 อัน

ลักษณะทั่วไป

กระดองมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างมากกว่าความยาว ผิวด้านบนมีกลุ่มขนกระจายอยู่ทั่วไป ส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านในมีลักษณะชันและแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก บนลอนทั้ง 4 นี้มีกลุ่มขนค่อนข้างยาวกระจัดกระจายอยู่ทั่วไป บริเวณ mesogastric ชัดเจนกว่าบริเวณอื่น บริเวณ branchial มีสันเฉียงขนานกัน 5 ถึง 6 แถว บริเวณ intestinal มีสันเฉียง 2 แถวทำมุมฉากกับสันเฉียงบริเวณ branchial ทั้งสองข้าง ขอบด้านข้างกระดองหลังมุมขอบตาด้านนอกมีรอยหยักเป็นแง่ยื่นข้างละ 1 อัน ขอบด้านหน้าโค้งเป็นคลื่นและเว้าเข้าตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 เรียวเล็กอยู่ในช่องเบ้าตา

ก้าม แข็งแรง ขอบด้านใน merus หยักเป็นฟันเลื่อยขนาดต่างกัน ขอบด้านบนตรงปลายมีแง่ยื่น 1 อัน ผิวบน carpus เป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายทั่วไป ขอบด้านในมีแง่ยื่นรูปสามเหลี่ยม 1 อัน ใต้แง่ยื่นนี้มีปุ่มเล็ก ๆ เรียงกันเป็นแถวตามแนวตั้งฉาก 3 ถึง 4 อัน ผิวด้านบน propodus มีสันตามยาวแบบ pectinate 1 แถว พบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย ผิวด้านใน propodus มีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็ก ๆ 10 ถึง 11 อันเรียงเป็นแถว 1 แถวนูนขึ้นมาเด่นชัดมาก ส่วนผิวด้านนอกเป็นเม็ดเล็กๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป บริเวณตรงกลางมีลักษณะเป็นสันตามยาวขนาดสั้น 1 แถว ขอบด้านบนของ dactylus มีปุ่มเล็ก ๆ รูปสี่เหลี่ยมขนาดเท่า ๆ กัน จำนวน 40 ถึง 60 อัน เรียงตัวเป็นแถวตลอดความยาวของ dactylus ซึ่งพบทั้งในตัวผู้และตัวเมีย

ขาเดินทั้ง 4 คู่แข็งแรง ขอบด้านหน้าของ merus ใกล้กับส่วนปลายมีแง่ยื่นออกมา 1 อัน ขอบด้านหลังเรียบ merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวประมาณ 2 เท่าของความกว้าง propodus มีความยาวประมาณ 1.5 เท่าของ dactylus ขอบด้านหน้าและด้านหลัง propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

ส่วนท้องของตัวผู้ค่อนข้างกว้าง ปล้องที่ 6 มีความยาวประมาณ ครึ่งหนึ่งของความกว้าง ขอบด้านข้างส่วนปลายมนโค้งสอบเข้าข้างใน

อวัยวะเพศผู้เป็นแท่งยาว มีขนประปรายตามขอบด้านข้าง ส่วนปลายแผ่ขยายออกเล็กน้อย มีลักษณะมนโค้ง ผิวด้านนอกตรองกลางมีร่องลึก มีส่วนยื่นตรงปลายสุด เป็นสารพวกไคติน ลักษณะเป็นแผ่นแบนปลายตัด มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลอมม่วง มีกลุ่มขนสีน้ำตาลปกคลุมทั่วไป ก้ามหนีบมีสีม่วงอมแดง ส่วนปลายสุดของ dactylus มีสีขาว และปลายสุด fix finger มีสีน้ำตาล ก้านตาสีม่วง ตาสีดำ

ถิ่นอาศัย

ขุดรูอยู่บริเวณริมฝั่งแม่น้ำที่เป็นน้ำกร่อย หรือชายฝั่งทะเลที่มีสภาพเป็นป่าชายเลนอยู่ในเขตเหนือระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตาย ดินเป็นโคลนค่อนข้างแข็ง รูปูแสมมีขนาดค่อนข้างใหญ่ บางครั้งพบเข้าไปอาศัยในรูของปูทะเล บริเวณปากรูปูแสมจะพบรอยเดินมากมายของปู เนื่องจากปูแสมออกหากินตลอดเวลาในช่วงน้ำลง เมื่อมีภัยจะวิ่งลงรู สักครู่จะโผล่ออกมาอีก ในการจับปูแสมนั้นพบว่าชาวบ้านนิยมจับในตอนกลางคืนเดือนมืด โดยใช้ตะเกียงแก๊สสำหรับส่องปูแสมที่ออกหากิน ใช้มือเปล่าหรือใส่ถุงมือตะครุบแล้วบีบให้แน่นใส่ข้องเก็บไว้ หรืออาจใช้ไม้ไผ่ปลาย

แหลมคอยดักแทงรูกันไม่ให้ปูหนีลงรูได้ นักจับปูบางคนใช้เท้ากระทืบหนัก ๆ หลาย ๆ ครั้งเหนือรู ปูแสมก็จะคลานขึ้นมาให้จับ บางคนจะออกจับปูแสมในช่วงน้ำเกิด เมื่อน้ำท่วมรู ปูแสมจะหนีขึ้นไปเกาะตามกิ่งไม้ ต้นไม้ในป่าชายเลน ก็สามารถเลือกจับได้ทีละมาก ๆ ปูแสมบางตัวมีปรสิตพวก *succulina* sp. เกาะอยู่บริเวณส่วนท้อง ทำให้ส่วนท้องของปูตัวผู้แผ่ขยายกว้างออกคล้ายตัวเมีย

การแพร่กระจาย

ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา ปัตตานี นราธิวาส ฝั่งทะเลอันดามัน ฟิลิปปินส์ ปัตตาเวีย ชวา เซเลเบส บอร์เนียว หมู่เกาะเมอไก มากาสซาร์ สิงคโปร์ ปีนัง ปอนเตียนัค ซาราวัค มาลัคคา

2.3.2.3 *Sesarma moeschii*

จัดอยู่ใน

Subfamily	Sesarminae
Genus	Sesarma
Subgenus	Sesarma
Species	moeschii (de Man, 1892)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัย การแพร่กระจายมีดังนี้ (สุพจน์ แสงมณี, 2530)

ชื่อสามัญ ปูแสม

ลักษณะเด่น

บริเวณผิวด้านบนกระดองเรียบ ขอบด้านข้างมีรอยหยักเป็นแง่ยื่นข้างละ 1 อันอยู่หลังมุมขอบตาด้านนอก บางทีมีร่องรอยของแง่ยื่นขนาดเล็กถัดมาทางด้านหลังอีก 1 อัน ผิวด้านในของ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก้ามมีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็ก ๆ 8 ถึง 10 เม็ดเรียงกันเป็นแถว 1 แถวอย่างชัดเจน merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวมากกว่า 2 เท่าของความกว้างเล็กน้อย

ลักษณะทั่วไป

กระดองมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส โค้งนูนเล็กน้อยตามความยาว พื้นผิวเรียบ มีความกว้างมากกว่าความยาว front กว้างมากกว่าครึ่งหนึ่งของระยะระหว่างมุมขอบตาด้านนอกทั้งสองข้าง และแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก ร่องตรงกลางของ cervical ลึกมาก บริเวณ mesogastric และ hepatic ชัดเจน บริเวณ branchial มีสันเฉียง 5 ถึง 6 แถว ขอบด้านข้างของกระดองเป็นแนวตรงเกือบขนานกันขยายออกเล็กน้อยทางด้านหลัง หลังมุมขอบตาด้านนอกมีรอยหยักเป็นแง่ยื่น 1 อัน บางทีมีร่องรอยของแง่ยื่นขนาดเล็กถัดมาทางด้านหลังอีก 1 อัน ขอบด้านหน้ากระดองโค้งเป็นคลื่นและเว้าเข้าเล็กน้อยตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 อยู่ในช่องเบ้าตา

ก้ามมีลักษณะแข็งแรงมากกว่าขาเดินมาก ขอบด้านในส่วนโคนของ merus มีแง่ยื่นออกมาเป็นฟันเลื่อยขนาดเล็ก ส่วนปลายค่อนข้างเรียบและไม่แผ่ขยายออก ผิวด้านบนของ carpus มีเม็ดเล็ก ๆ เรียงกันเป็นแถวสั้น ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป มีขนสั้น ๆ ขึ้นประปราย ขอบด้านในโค้งและไม่มีแง่ยื่น ผิวด้านบนของ palm เป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะตรงขอบบน เม็ดเล็ก ๆ จะเรียงตัวเป็นแถวตามความยาว 1 แถว ผิวด้านใน palm มีสันตามขวางซึ่งเกิดจากเม็ดเล็ก ๆ 8 ถึง 10 เม็ดเรียงต่อกันเป็นแถว 1 แถวเห็นชัดเจน ผิวด้านนอกเป็นเม็ดเล็ก ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ตรงกลางจะมีสันตามยาวขนาดสั้น 1 แถว ผิวด้านบนส่วนโคนของ dactylus เป็นเม็ดเล็ก ๆ เรียงกันกระจัดกระจาย ส่วนปลายเรียบ ปลายสุดก้ามหนีบมีลักษณะคล้ายปากคีบมีสีน้ำตาล

ขาเดินทั้ง 4 คู่แข็งแรง ขอบด้านหน้า merus ใกล้ส่วนปลายมีแง่ยื่น 1 อัน ขอบด้านหลังเรียบ merus ของขาเดินคู่ที่ 3 ยาวมากกว่า 2 เท่า ของความยาวเล็กน้อย ขอบด้านหน้าและด้านหลังของ propodus และ dactylus มีกลุ่มขนสีน้ำตาลปกคลุมหนาแน่น

ส่วนท้องปล้องที่ 6 ของตัวผู้ยาวกว่าปล้องที่ 5 มีความกว้างน้อยกว่า 2 เท่าของความยาว ขอบด้านข้างส่วนปลายมนโค้งสอบเข้าเล็กน้อย ปล้องที่ 7 มีความกว้างใกล้เคียงกับความยาว

อวัยวะเพศผู้ มีลักษณะเป็นแท่งโค้งค่อนข้างสั้น ส่วนปลายมนทู่และมีส่วนยื่นซึ่งเป็นสารพวกไคตินออกมาเล็กน้อย มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลอมดำมัน ก้ามหนีบมีสีแดงอมส้ม ก้านตาและตามีสีเทาอมดำ

ถิ่นอาศัย

หลบซ่อนอยู่ใต้ใบไม้ ขอนไม้ หรือขุดรูอยู่ในดินค่อนข้างแข็งแรง บริเวณป่าชายเลนซึ่งเชื่อมต่อกับป่าบก ป่าจาก อยู่ในเขตเหนือระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตาย

การแพร่กระจาย

ตราด จันทบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลาปัตตานี เขตอินโด- แปซิฟิค หมู่เกาะเมอไก สุราบายา ฮ่องกง ไต้หวัน เซเลเบส

2.3.2.4 *Sesarma polita*

จัดอยู่ใน

Subfamily	Sesarminae	
Genus	Sesarma	
Subgenus	Sesarma	
Species	polita	(de Man, 1887)

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัย การแพร่กระจายมีดังนี้ (สุพจน์ แสงมณี, 2530)

ชื่อสามัญ ปูซองจาก

ลักษณะเด่น

กระดองเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นผิวเรียบ มีความยาวมากกว่าความกว้างอย่างเด่นชัด front แบ่งออกเป็น 4 ลอน ผิวมีปุ่มแหลมคมเรียงตัวเป็นแถวตามขวางหลายแถว ผิวของก้ามหนีบเป็นปุ่มเล็ก ๆ แหลมคมกระจัดกระจายอยู่ทั่วไป merus ของขาเดินทั้ง 4 คู่เรียว ส่วนท้องปล้องสุดท้ายของตัวผู้เรียวยาว

ลักษณะทั่วไป

กระดองแบนมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า พื้นผิวเรียบ มีความยาวมากกว่าความกว้างอย่างเด่นชัด front มีความกว้างมากกว่าครึ่งหนึ่งของระยะระหว่างมุมขอบตาด้านนอกทั้งสองข้าง และแบ่งเป็น 4 ลอนชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่นอก ผิวบนลอนทั้ง 4 นี้มีปุ่มเล็ก ๆ แหลมคมเรียงกันเป็นแถวตามขวางหลายแถว บริเวณ mesogastric , cardiac และ intestinal ชัดเจน ส่วนบริเวณ branchial มีสันเฉียง 1 แถวใกล้กับขอบด้านหลัง ขอบหลังมุมขอบตาด้านนอกโค้งเล็กน้อย และมีแง่แหลมยื่นออกมา 3 ถึง 4 อัน ขอบด้านหน้ากระดองมีรอยหยักเป็นหนามแหลมหลายอัน และเว้าลึกเป็นรูปตัว V ตรงกลาง เบ้าตาเฉียง หนวดคู่ที่ 1 พับตามขวางอยู่ใต้ front หนวดคู่ที่ 2 อยู่ในช่องเบ้าตา

ก้ามแข็งแรง ขอบด้านในของ ischium และ merus มีแง่ยื่นเป็นฟันเลื่อยหลายอัน ผิวด้านบน carpus เป็นสันแบบ pectinate สั้นๆ ตามขวางหลายอัน ขอบด้านในโค้งและมีปุ่มแหลมคมเรียงกันห่าง ๆ เป็นแถว ผิวด้านบน palm เป็นปุ่มแหลมเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป มีสันแบบ pectinate 2 ถึง 3 อัน และตรงปลายเป็นแง่ยื่นแหลมคม 1 อัน ผิวด้านในเป็นปุ่มแหลมเล็ก ๆ เรียงเป็นกลุ่มตามขวางแต่ไม่เป็นสัน ผิวด้านนอกเป็นปุ่มเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป ส่วนที่ใกล้กับ ๆ dactylus ทั้งผิวด้านนอกและด้านในมีปุ่มขนาดใหญ่ด้านละ 2 ปุ่ม ส่วนขอบด้านล่างเป็นปุ่มแหลมเรียงกันเป็นแถวตามความยาว ขอบบน dactylus มีปุ่มเล็ก ๆ แหลมคมจำนวน 12 ถึง 13 อัน เรียงกันเป็นแถวตามความยาว ผิวด้านนอกเรียบ มีช่องว่างระหว่างก้ามหนีบมากและมีฟันตรงส่วนโคน dactylus 2 อัน

ขาเดินทั้ง 4 คู่ค่อนข้างเรียว ขอบด้านหน้า merus เป็นปุ่มเล็กมาก ใกล้ส่วนปลายมีแง่แหลมคม 1 อัน ขอบด้านหลังเรียบ ยกเว้นขาเดินคู่ที่ 1 และ 2 ใกล้ส่วนปลายมีหนามแหลมเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวแบบฟันเลื่อย merus ของขาเดินคู่ที่ 3 ยาวเป็น 3.5 เท่าของความกว้าง carpus มีส่วนปลายกว้างกว่าส่วนโคน ผิวด้านนอกมีสันตามยาว 2 อัน อาจมีขนบนสันด้วย ผิวด้านในมีสัน

ตามยาว 1 สัน propodus ของขาเดินคู่แรกกว้างกว่าคู่อื่น ๆ ขอบด้านหน้าและด้านหลัง propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีกลุ่มขนหนาแน่น

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 กว้างเป็น 2 เท่าของความยาว ปล้องสุดท้ายมีความยาวมากกว่าความกว้าง ขอบด้านข้างขนานกัน ขอบส่วนปลายของปล้องที่ 5 เว้าเข้าเล็กน้อยตรงกลาง

อวัยวะเพศผู้เป็นแท่งสั้น ส่วนปลายโค้งมน ส่วนยื่นปลายสุดค่อนข้างสั้นเป็นสารพวกไคติน มีกลุ่มขนปกคลุมหนาแน่น

สี กระดอง ขาเดิน มีสีน้ำตาลอมม่วง ก้ามหนีบมีสีแดงเข้ม ตามขอบมีสีค่อนข้างดำ

ถิ่นอาศัย

พบอาศัยอยู่ในป่าจาก โดยแทรกตัวอยู่ระหว่างกาบใบจาก อยู่ในเขตระดับน้ำขึ้นสูงสุดของช่วงน้ำตายจนถึงระดับน้ำลงเฉลี่ย

การแพร่กระจาย

ชุมพร สุราษฎร์ธานี ปัตตานี นราธิวาส เขตอินโด- แปซิฟิก หมู่เกาะเมอไก หมู่เกาะนิโคบาร์ สิงคโปร์ เกาะซัลลิแวน ชายฝั่งตะวันตกของหมู่เกาะอินเดีย

2.3.2.5 *Sesarma bocourti*

จัดอยู่ใน

Subfamily	Sesarminae	
Genus	Sesarma	
Subgenus	Sesarma	
Species	bocourti	(A.Milne Edwards, 1869)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะเด่น ลักษณะทั่วไป ถิ่นอาศัย การแพร่กระจายมีดังนี้ (สุรินทร์ มัจฉาชีพ, 2516)

ลักษณะเด่น

บริเวณขอบด้านใน carpus ของก้ามมีแง่ยื่น 1 อัน พื้นผิวด้านนอก propodus ของก้ามแบนมาก ขาเดินทุกคู่ค่อนข้างแบนและกว้าง

ลักษณะทั่วไป

กระดองลักษณะเป็นรูปคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างมากกว่าความยาว บริเวณส่วนหน้าของกระดองระหว่างขอบตาด้านในมีกลุ่มขนสั้น ๆ เรียงกันกระจัดกระจายเป็นแถวตามขวาง และมีความกว้างมากกว่าครึ่งหนึ่งของระยะทางระหว่างมุมขอบตาด้านนอกทั้งสองข้าง ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ลอนอย่างชัดเจน ลอนคู่ในมีขนาดใหญ่กว่าลอนคู่ด้านนอก บริเวณ mesogastric จะชัดเจนกว่าบริเวณอื่น บนบริเวณ hepatic มีลักษณะเป็นปุ่มขนาดใหญ่ 1 ปุ่ม และปุ่มขนาดเล็ก 3 ถึง 4 ปุ่ม บริเวณ branchial มีสันเฉียง 5 ถึง 6 แถว ขอบตาด้านข้างของกระดองเป็นแนวตรงและขยายออกเล็กน้อยทางด้านหลัง บริเวณหลังมุมขอบตาด้านนอกมีรอยหยักเป็นแง่ยื่น 1 อัน ขอบตาด้านหน้าของกระดองเว้าเข้าเล็กน้อยบริเวณตรงกลาง

ก้ามมีลักษณะแข็งแรง ขอบตาด้านในของ ischium และ merus มีแง่ยื่นเป็นฟันเลื่อยจำนวนหลายอัน ขอบตาด้านบนของ merus ใกล้กับส่วนปลายเป็นแง่ยื่นไม่แหลมคม พื้นผิวด้านบนของ carpus เป็นปุ่มเล็ก ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ขอบตาด้านในมีแง่ยื่น 1 อัน พื้นผิวด้านบนและด้านนอกของ propodus เป็นปุ่มเล็ก ๆ กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งมีลักษณะแหลมคมและเรียงตัวเป็นแถวทางขอบด้านล่าง พื้นผิวด้านนอกของ dactylus มีปุ่มเล็ก ๆ แหลมคมจำนวนมากเรียงกันเป็นแถวตามความยาว

ขาเดิน ทั้ง 4 คู่ค่อนข้างแบนและกว้าง ขอบด้านหน้าของ merus ใกล้กับส่วนปลายมีแง่ยื่นออกมา 1 อัน ส่วนขอบด้านหลังเรียบ merus ของขาเดินคู่ที่ 3 มีความยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง บริเวณขอบด้านหน้า propodus และ dactylus ของขาเดินทุกคู่มีกลุ่มขนหนาแน่น ส่วนบริเวณขอบด้านหลังมีขนแข็งคล้ายหนามเรียงกันห่าง ๆ เป็นแถวตามความยาว

ส่วนท้อง ปล้องที่ 6 ของตัวผู้จะยาวกว่าปล้องที่ 5 ส่วนยื่นตรงปลายของอวัยวะเพศผู้เป็นสารพวกไคติน ลักษณะเป็นแท่งใหญ่และสั้นมีขนปกคลุมอยู่อย่างหนาแน่น

สี กระดองและขาเดินมีสีน้ำตาลเข้ม ก้ามหนีบเป็นสีแดงเลือดหมู

ถิ่นอาศัย

ขุดรูอยู่ตามป่าจาก บริเวณปากแม่น้ำ

การแพร่กระจาย

สมุทรปราการ นครศรีธรรมราช บริเวณอินโด- แปซิฟิก บอร์เนียว สุมาตรา ซาราวัก และพอนเทียนัค

2.4 Indirect peroxidase immunohistochemistry

เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน (antigen) ซึ่งก็คือเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อปู อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อกัน โดยเทคนิคนี้เป็นแบบวิธีอ้อม (indirect) คือใช้แอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ horseradish peroxidase มาจับกับแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นเติมสับสเตรท คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และ chromogen ที่ทำให้เกิดสี ได้แก่ 3,3' – diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ปฏิกิริยาที่ได้เกิดขึ้นโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ horseradish peroxidase กลายเป็นผลิตผล ได้แก่ ออกซิเจนและน้ำ ออกซิเจนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะไปทำปฏิกิริยากับ DAB เปลี่ยนสภาพจากสารละลายเป็นตะกอนจับอยู่ที่บริเวณแอนติบอดีจับกับแอนติเจนทำให้เกิดการติดสีบริเวณที่มีแอนติเจนอยู่ หลังจากนั้นจึงย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีฮีมาทอกไซลินเป็นสีน้ำเงินบริเวณนิวเคลียส และอิโอซินเป็นสีแดงบริเวณไซโตพลาสมทำให้สามารถมองเห็นและระบุชนิดเนื้อเยื่อโดยรอบได้ โดยวิธีทางอ้อม หรือ indirect นี้ ยังช่วยให้เพิ่มความไวในการติดสี เนื่องจากมีแอนติบอดีตัวที่สองจำนวนมากสามารถจับแอนติบอดีตัวแรกแต่ละตัว จึงเป็นการเพิ่มจำนวนโมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยาการตกตะกอนที่ตำแหน่งที่แอนติบอดีจับอยู่ และไม่เกิดความยุ่งยากต่อการนำเอนไซม์ไปติดกับแอนติบอดีตัวแรกที่ผลิตและมีปริมาณอยู่จำกัดด้วย (ยัยนับ แวะและ , 2545 ; Paisarn Sithigorngul, 2000)

ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับตัวรวมกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีของการวิจัยครั้งนี้ ได้ใช้แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากห้องปฏิบัติการ เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองสูงมาก สามารถตรวจเจอการติดเชื้อไวรัสนี้ได้ในระยะเริ่มแรกได้ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ผลิตขึ้นจากการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วน haemolymph ของกุ้งกุลาดำที่ทดลองให้ติดเชื้อหัวเหลืองมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปฉีดในหนูขาว สามารถผลิต hybridoma clone ได้ แอนติบอดีที่นำมาใช้ตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อปูในการวิจัยครั้งนี้ 3 ชนิด ได้แก่

แอนติบอดี V3 - 2 B สามารถจับจำเพาะต่อ envelope protein ของไวรัสหัวเหลืองขนาด 135 กิโลดาลตัน

แอนติบอดี Y18 – 2 D สามารถจับจำเพาะต่อ capsid protein ของไวรัสหัวเหลืองขนาด 67 กิโลดาลตัน

แอนติบอดี Y 19 สามารถจับจำเพาะต่อ matrix protein ของไวรัสหัวเหลืองขนาด 22 กิโลดาลตัน

(Paisarn Sithigorngul et al., 2000, 2002)

นอกจากนี้แอนติบอดีทั้งสามสามารถจับกับโปรตีนของไวรัสที่อยู่ในสภาพปกติหรือถูกทำให้เสียสภาพด้วยสาร SDS

2.5 one step RT- PCR

ในการยืนยันผลด้วย RT-PCR หรือ reverse transcription polymerase chain reaction คือ การนำเทคนิค PCR มาใช้ตรวจวิเคราะห์ RNA โดยขั้นตอนสำคัญ เริ่มต้นด้วยการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของปูตัวอย่าง แล้วใช้ RNA นี้เป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription ให้สังเคราะห์ cDNA (complementary DNA) จากนั้นจะใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primer สองสาย ที่สังเคราะห์มาเพื่อขยายตำแหน่งที่สนใจบน cDNA นั้น ซึ่งได้แก่

primer 10 F (Forward primer :5'CCGCTAATTTCAAAAACTACG3')

primer 144R (Reverse primer :5'AAGGTGTTATGTCGAGGAAG3')

(Chainarong Wongteerasupaya et al., 1997)

ผลิตผล PCR ที่ขยายจำนวน cDNA สามารถตรวจวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ด้วยวิธีagarose gel electrophoresis ซึ่งคาดว่าผลผลิตที่จะได้จากการทดลองนี้เมื่อตรวจพบไวรัสหัวเหลืองจะพบแถบปรากฏอยู่ในช่วง 135 คู่เบส โดยวัดเทียบกับ molecular weight marker 100 bp DNA ladder ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

2.6 การศึกษาและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไวรัสหัวเหลือง

Anderson และ Prior (1992) ทำการวิจัยพบไวรัส non - occluded baculovirus 2 ชนิด โดยชนิดแรกศึกษาในกุ้ง crayfish *Cherax quadricarinatus* และอีกชนิดหนึ่งนั้นศึกษาในปูทะเล *Scylla serrata* โดยสัตว์ทดลองทั้งสองชนิดจับจากประเทศออสเตรเลียทั้งในระยะวัยรุ่น และ ตัวเต็มวัย พบว่าไวรัสทั้งสองชนิดนี้ ไม่ทำให้เกิดอาการของโรคแต่จะเห็นลักษณะการกระจายการติดเชื้อไวรัสโดยพบเซลล์ลักษณะเป็น hypertrophy ที่เซลล์ผิวของอวัยวะตับและตับอ่อน จากกุ้ง crayfish *Cherax quadricarinatus* ที่นำมาศึกษาพบจำนวน 52 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนทั้งหมดได้รับการติดเชื้อ cherax baculovirus (CBV) เมื่อนำส่วนของตับและตับอ่อนมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา พบภายในนิวเคลียสของเซลล์มี inclusion ที่ย้อมติดสีอิโอซิน และเซลล์เยื่อบุผิวของเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อไวรัสมีขนาดนิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้นเป็น 2.5 เท่าของเซลล์ปกติ เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบ nucleocapsid มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก ขนาดโดยเฉลี่ย 34 x 4 นาโนเมตร และอนุภาคไวรัสมีความยาว 172 – 220 นาโนเมตร ปกคลุมด้วยเยื่อหุ้มอย่างหลวม ๆ ในการตรวจสอบในปูทะเล *Scylla serrata* พบ 27 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมดได้รับเชื้อ Scylla baculovirus (SBV) โดยภายในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวตับและตับอ่อนพบ inclusion ที่ย้อมติดสีเบส และนิวเคลียสมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นถึง 5 เท่าของเซลล์ปกติ nucleocapsid มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก ขนาดโดยเฉลี่ย 24 x 205 นาโนเมตร และอนุภาคไวรัสมีความยาว 24 – 253 นาโนเมตร มีเยื่อหุ้มและมีเส้นใยยื่นออกมาโดยรอบอนุภาคของ SBV เรียงตัวกันในชั้นในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส พบเห็นการบัดดิ้งผ่านผนังเมมเบรนของนิวเคลียสและเกิดเยื่อหุ้มใหม่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 75 ถึง 80 นาโนเมตร

Chaiyuth Chantanachookin และคณะ (1993) ทำการศึกษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำที่มีอาการของโรคหัวเหลืองโดยเก็บตัวอย่างจากบ่อกุ้งที่มีการระบาดของโรคหัวเหลืองจากในส่วนภาคใต้ของประเทศไทยช่วงเดือนกุมภาพันธ์และสิงหาคมปี 1992 โดยนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา พบเห็นส่วนสีเหลืองบริเวณ dorsal caphalothorax ซึ่งเป็นผลมาจากที่อวัยวะส่วนตับและตับอ่อน เกิดลักษณะสีเหลือง สามารถมองเห็นผ่านcarapace ในกุ้งที่ป่วยด้วยโรคหัวเหลืองนี้ และนอกจากนี้ยังพบลักษณะของเนื้อเยื่อของอวัยวะน้ำเหลือง มีลักษณะผิดปกติอย่างชัดเจน มีการตาย(necrosis)ของเซลล์ พบเซลล์นิวเคลียสในเซลล์แวคิวโอลเกิดการบวม และพบ inclusion มีลักษณะกลมในไซโตพลาสมที่ติดสีเบสอยู่ใกล้กับนิวเคลียสที่บวม ซึ่งยังได้พบinclusionลักษณะเดียวกันนี้ที่ส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ทางเดินอาหารส่วนกลาง
กล้ามเนื้อหัวใจ เนื้อเยื่อเหงือก และอวัยวะสร้างเม็ดเลือด โดยลักษณะดังกล่าวนั้นไม่เหมือนกับโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือปรสิต และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จะเห็นไวรัสหัวเหลืองที่มีรูปร่างเป็นแท่ง rod – shaped virus และมีเนื้อเยื่อหุ้มไวรัสจะอยู่ในส่วนไซโตพลาสมที่ติดกับนิวเคลียสของเซลล์เนื้อเยื่อหลายชนิด และจะพบไวรัสส่วนที่แยกอยู่เป็นอิสระในส่วนที่ว่างระหว่างของเซลล์ นอกจากนี้ยังได้ให้ความเห็นว่า ไวรัสหัวเหลืองมีความคล้ายคลึงกับ granulosis virus (Baculoviridae) ซึ่งพบได้ในสัตว์จำพวกแมลงในแง่ของ ขนาด รูปร่าง ตำแหน่งที่พบในส่วนของไซโตพลาสม และการพัฒนาเติบโตของไวรัส

Lu, Tapay, Brock และคณะ (1994) ทำการศึกษาการติดเชื้อและอาการของโรคไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง 2 ชนิด คือ blue shrimp *Penaeus stylirostris* และ white shrimp *Penaeus vannamei* ซึ่งเป็นกุ้งที่นิยมเพาะเลี้ยงกันมากในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกาและกลุ่มประเทศแถบตะวันตก โดยทำการเหนี่ยวนำการติดเชื้อโดยการฉีดสารสกัดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ได้จากส่วนของเนื้อเยื่อส่วนหัว cephalothorax ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* จากประเทศไทย พบกุ้งทดลองแสดงอาการของโรค ได้แก่ กุ้งแสดงอาการอ่อนเพลีย ทรงตัวไม่ได้ และไม่มีความรู้สึกต่อสิ่งกระตุ้นภายนอก เปลือกกุ้งจะเปลี่ยนเป็นสีแดง แต่ไม่พบการเกิดสีเหลืองของตับ ตับอ่อน และเหงือกเหมือนที่พบในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ส่วนในการศึกษาทาง histology พบการตายของเซลล์เป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อ ectodermal และเนื้อเยื่อส่วน mesenchymal และจากการวิเคราะห์ชิ้นส่วนเหงือก ตับและตับอ่อนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสลักษณะ non – occluded rod – shaped baculovirus ขนาด 130 – 197 X 45 – 48 นาโนเมตร ในส่วนไซโตพลาสมของเซลล์ที่ติดเชื้อ ดังนั้น ผลสรุปที่ได้ คือ กุ้งทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถรับเชื้อไวรัสหัวเหลืองและก่อให้เกิดการตายภายในระยะเวลาใกล้เคียงกันกับกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง

Lu, Tapay, Loh และคณะ (1995) รายงานถึงการแพร่กระจายเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ รวมถึงพิสูจน์ทราบอวัยวะเป้าหมายที่จะเกิดการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสหัวเหลือง เพื่อใช้เป็นแหล่งแรกในการจะแยกเชื้อไวรัสและตรวจวินิจฉัยโรคในโอกาสต่อๆไป ในการทดลองได้ศึกษาเนื้อเยื่อและอวัยวะ 9 ส่วนของกุ้ง *Penaeus vannamei* โดยทำให้ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการฉีดสารสกัดจากส่วนหัว cephalothorax ของกุ้งที่มีเชื้อไวรัสหัวเหลือง และนำส่วนเหงือก เส้นประสาท อวัยวะน้ำเหลือง หัวใจ ทางเดินอาหารส่วนกลาง ตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อส่วนหัว กล้ามเนื้อส่วนท้อง และก้านตา ไปทดสอบวิธี Bioassay โดยใช้กุ้ง penaeid เป็นตัวเปรียบเทียบ และทดสอบ TCID50 จากการเพาะเลี้ยงเซลล์อวัยวะน้ำเหลืองของกุ้ง ผลที่ได้พบว่าเนื้อเยื่อและอวัยวะทั้งหมดที่ศึกษามีการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง หลังจากนั้นทำการฉีดของเหลวที่ได้จากเนื้อเยื่อและอวัยวะเหล่านี้ให้กุ้งทดลอง พบว่ากุ้งทั้งหมดที่นำไปทดสอบตายภายในระยะเวลา 6 – 9 วัน และในส่วนการทดสอบ TCID50 พบว่า ส่วนอวัยวะน้ำเหลืองกุ้ง เหงือก และเนื้อเยื่อส่วนหัว มีปริมาณไตเตอร์ของไวรัสหัวเหลืองสูงกว่าเนื้อเยื่อหรืออวัยวะอื่นๆ 10 – 800 เท่า เพราะฉะนั้นอวัยวะทั้ง 3 ส่วนนี้น่าจะเป็นเป้าหมายแรกในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงควรจะใช้อวัยวะทั้ง 3 ส่วนนี้ในการศึกษาตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองต่อไป

Jiraporn Kasornchandara, Kidchakarn Supamattaya และ Sitdhi Boonyaratpalin (1995) ศึกษาขั้นตอนการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัสหัวเหลืองในอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยการฉีดสารสกัดไวรัสหัวเหลืองเข้าไปในกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ต่อตัว เป็นจำนวนทั้งหมด 20 ตัว จากนั้นเก็บอวัยวะน้ำเหลือง หลังจากฉีดไวรัสไปที่เวลา 12 18 24 32 48 และ 56 ชั่วโมง นำมาตรึงใน glutaraldehyde ความเข้มข้น 6.25 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์ Sorense เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก และสุดท้ายนำไปฝังใน Epon – 812 เพื่อนำไปตัดเป็นชิ้นเนื้อเยื่อ ย้อมด้วย Uranyl acetate และ lead citrate เมื่อตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อเหล่านี้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้งหลังจากที่ฉีดไวรัสไปในชั่วโมงที่ 12 นั้นยังไม่พบอนุภาคของไวรัส แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 18 และ 24 จะพบการเพิ่มจำนวนอนุภาคของไวรัสซึ่งเกิดขึ้นในนิวเคลียส และในชั่วโมงที่ 32 พบการพัฒนาเติบโตเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน จนเกิดการรวมตัวเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ในไซโตพลาสม เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 และ 56 พบจำนวนอนุภาคไวรัสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งมีผลทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลายอย่างรวดเร็ว กุ้งกุลาดำนั้นตายภายในเวลา 48 – 56 ชั่วโมงหลังการได้รับเชื้อหัวเหลือง

Chainarong Wongteerasupaya และคณะ (1995) รายงานการวิจัยแยกกรดนิวคลีอิคออกจากเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ เพื่อพิสูจน์ถึงการมีองค์ประกอบเป็น DNA สายคู่จากผลการอ้างอิงของรายงานอื่นๆที่กล่าวไว้ในระยะแรก ซึ่งได้ระบุไว้ว่าไวรัสหัวเหลืองมีแกนกลาง viral core ประกอบด้วย DNA จึงควรจัดไวรัสนี้ให้อยู่ในชนิด granulosis – type baculovirus คณะวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองทั้งหมด 3 การทดลอง นั่นคือ ได้สกัด DNA จากไวรัสที่มีปริมาณเข้มข้น แต่ปรากฏผลที่ได้นั้นเห็นเพียงแค่ร่องรอยของ DNA ซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้จากการย้อมสี ethidium bromide ในเจลอากาโรส และหลังจากนั้นได้เลือก recombinant clone จากการนำเอา DNA เหล่านั้นมารวมกัน ก็ยังพบว่าไม่เกิดการจับ hybridize กับ host shrimp DNA และ เมื่อทำ วิธีทาง *in situ* DNA hybridization พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาใดๆกับเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อหัวเหลือง ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อตรวจสอบ negatively stain ของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าไวรัสมีลักษณะต่างไปจาก baculovirus ดังนั้น จึงได้ทำการทดลองอีกครั้งโดยการสกัดกรดนิวคลีอิคจากไวรัสหัวเหลืองบริสุทธิ์โดยมุ่งดูผลที่สกัดออกมาได้เป็น RNA มากกว่าที่จะเป็น DNA จากการเก็บเลือดจากกุ้งทั้งหมด 200 ตัว ที่ได้รับการฉีดให้เหนี่ยวนำด้วยไวรัสหัวเหลืองจนกุ้งแสดงอาการถึงระยะสุดท้ายของโรค นำไปผ่านการปั่นในแบบ Urografingradient ultracentrifugation จากความเข้มข้น 22 เปอร์เซ็นต์ไปเป็น ความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในบริเวณความเข้มข้นที่ 30 ถึง 37 เปอร์เซ็นต์ให้ผลที่สะอาดและมีปริมาณอนุภาคไวรัสมากที่สุด เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน พบไวรัสรูปร่างแท่ง มีชั้นเนื้อเยื่อห่อหุ้ม ขนาด 150 – 170 X 40 – 50 นาโนเมตร มีปุ่มปมความยาว 11 นาโนเมตร ยื่นออกมาโดยรอบ ส่วนกรดนิวคลีอิคที่ได้จากการสกัดด้วยสาร guanidium thiocyanate และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย CsCl gradient ultracentrifugation จะได้เป็นกรดนิวคลีอิคที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและพบว่าสามารถทำให้ลดขนาดลงได้ด้วย Rnase – A มิใช่ Dnase I และเมื่อสังเกตลักษณะของ negatively stained virion และลักษณะ RNA ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน สามารถสรุปได้ว่า เชื้อไวรัสหัวเหลืองมีความคล้ายคลึงกับไวรัสชนิด rhabdovirus หรือ coronavirus มากกว่า baculovirus

Spann, Vickers และ Lester (1995) ได้ทดลองนำกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* จากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย 4 ฟาร์ม โดยมีจำนวนทั้งหมด 40 ตัว น้ำหนักตัวละประมาณ 10 ถึง 30 กรัม มาตรวจดูลักษณะไวรัสภายในอวัยวะน้ำเหลือง พบลักษณะกลุ่มเซลล์ที่ผิดปกติ พบเซลล์มีท่อแต่ภายในไม่มีเส้นเลือดลำเลียงเม็ดเลือดแดง ซึ่งโดยปกติแล้วอวัยวะน้ำเหลืองในกุ้งจะต้องประกอบด้วยท่อที่มีเส้นเลือดลำเลียงเม็ดเลือดแดงล้อมรอบด้วย เนื้อเยื่อค้ำจุนของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณนี้เซลล์มีการขยายตัวเกิด hypertrophied nuclei มีขนาดใหญ่กว่านิวเคลียสปกติถึง 1.3 เท่า มีเซลล์แวคิวโอขนาดใหญ่ และ พบ inclusion

body ที่ย้อมติดสีเป็นผลบวกกับปฏิกิริยา Feulgen โดยให้เป็นสีเขียวอ่อน ซึ่งโดยทั่วไปถ้าเป็นเซลล์ท่อในอวัยวะน้ำเหลือง ปกติจะย้อมติดสีเขียวเข้ม ต่อจากนั้นตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบลักษณะไวรัสที่มีเยื่อหุ้มหนาแน่นเป็นทรงกระบอก มีขนาด 163 – 200 x 36 – 63 นาโนเมตร เรียงตัวอยู่ใน paracrystalline array ในส่วนไซโตพลาสม และนิวเคลียสของอวัยวะน้ำเหลือง และยังพบ array ของไวรัสในบริเวณไซโตพลาสมที่ส่วนของเซลล์เหงือก จำนวน 3 ถึง 60 อนุภาคไวรัส เมื่อผ่าอนุภาคไวรัสพบ electron dense nucleic acid cores และ เยื่อหุ้ม โดย nucleocapsid มีขนาด 83 – 590 x 13 – 15 นาโนเมตร อยู่เป็นอิสระในท่อภายในไซโตพลาสม นอกจากนี้ในส่วนของการทดลองย้อมสี negative stain ในการแยกอวัยวะน้ำเหลืองที่บริสุทธิ์ แสดงให้เห็นถึง nucleocapsid ที่มีปลายเป็นรูปทรงกรวย 1 ข้าง จากการวิเคราะห์ผลไวรัสดังกล่าว ให้ชื่อว่าเป็น lymphoid organ virus (LOV) นั้น มีลักษณะคล้ายคลึงกับ yellow-head virus (YHV) ที่พบจากประเทศไทยในลักษณะรูปร่างและโครงสร้างและในด้านพยาธิวิทยา และยังคล้ายกับ rhabdovirus ที่พบจากประเทศสหรัฐอเมริกาในแง่ของพยาธิวิทยาเช่นกัน

Lu, Tapay และ Loh (1996) ได้ทำงานวิจัยพัฒนาเทคนิค nitrocellulose enzyme – immunoassay (NC-EIA) ขึ้นเพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบกุ้งที่คาดว่าได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง โดยในการวิจัยนี้ได้ใช้แอนติบอดีแรก เป็น polyclonal hyperimmune IgG และใช้แอนติบอดีตัวที่ 2 เป็น Goat anti – rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) ส่วนสับสเตรตมี 2 ชนิด ได้แก่ DAB (3,3 ' – diaminobenzidine tetrahydrochloride) และ TMB (3,3 ',5,5 ' –tetramethylbezidine) แอนติเจนนั้นได้ใช้เชื้อไวรัสหัวเหลืองจากส่วนเหงือกและส่วนหัว cephalothorax ของกุ้ง *P.vannamei* ที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง จากผลการทดลองเมื่อใช้สับสเตรตเป็น TMB จะให้ผลที่อ่านได้ชัดเจน สังเกตง่ายด้วยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นให้สีฟ้า ถึงแม้ว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีเพียงเล็กน้อย แต่ในสับสเตรตจาก DAB จะให้ผลจากปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลซึ่งลักษณะสังเกตได้ยาก และ เมื่อจะทำให้เกิดปฏิกิริยาโดยDABนั้น จะต้องใช้ปริมาณโปรตีนโมเลกุลของเชื้อไวรัสหัวเหลืองถึง 0.8 นาโนเมตร ส่วนในการทดสอบความไวของการเข้าทำปฏิกิริยาในเทคนิค NC-EIA นี้ สามารถตรวจพบไวรัสหัวเหลืองในปริมาณไวรัสเพียงแค่ 100 TCID50 เท่านั้น ส่วนในแง่ของการใช้อวัยวะส่วนต่าง ๆ ของกุ้งที่ติดเชื้อนั้น ผลที่ได้พบว่า แอนติเจนที่มาจากเซลล์เหงือกให้ผลการตรวจจากวิธีการ NC-EIA ได้ดีที่สุด และยังแนะนำให้ใช้แอนติเจนเป็นเซลล์เหงือกเนื่องจากเป็นส่วนที่เตรียมได้ง่ายกว่าอวัยวะอื่นที่เป็นเป้าหมายสำคัญของไวรัสหัวเหลือง

Nadala และคณะ (1997) ทำการวิจัยโดยมีจุดประสงค์เพื่อนำเสนอการพัฒนาเทคนิค Western Blot (WB) มาปรับใช้ในการตรวจไวรัสในกุ้ง ซึ่งได้แก่ yellow - head virus (YHV) และ chinese baculovirus (CBV) โดยขั้นตอนการทำการทดลองนั้น นำกุ้ง *Penaeus vannamei* นำมาเหนี่ยวนำการติดเชื้อไวรัส ด้วยการฉีดไวรัสที่ได้จากสารสกัดเนื้อเยื่อส่วนหัวของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส YHV และ CBV แล้วจากนั้นนำเลือดมาตรวจด้วยวิธี Western Blot โดยใช้ ขั้นตอนของ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ร่วมอยู่ด้วย สามารถแยกโปรตีน G มีน้ำหนักโมเลกุล 135 กิโลดาลตัน และ โปรตีน L มีน้ำหนักโมเลกุล 170 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสหัวเหลืองได้อย่างชัดเจนที่เวลา 64 ชั่วโมงหลังจากฉีดไวรัสเหนี่ยวนำ ส่วนในการตรวจสอบเชื้อไวรัส CBV ผลที่เกิดให้ลักษณะแถบ nucleocapsid ของไวรัส เกิดขึ้นทั้งหมด 3 แถบที่เวลา 41 และ 43 ชั่วโมงหลังการฉีดไวรัสเหนี่ยวนำ โดยในขณะนั้นกุ้งทดลองยังไม่แสดงอาการป่วยจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 จึงจะสังเกตอาการได้ และนอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองใช้วิธี Western Blot ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออวัยวะน้ำเหลืองซึ่งสามารถแสดงผลภายในระยะเวลา 4 วันหลังการติดเชื้อ โดยผลที่ปรากฏนั้นเป็นผลของ gel electrophoresis รูปแบบลักษณะเดียวกันกับการตรวจจากเลือด ผลสรุปข้อดีของเทคนิค Western Blot นั้นคือให้ความแม่นยำ รวดเร็ว และไวต่อปริมาณไวรัสที่ยังไม่ถึงขนาดที่จะทำให้กุ้งเกิดอาการของโรคและในการตรวจสอบเลือดทำได้โดยสัตว์ทดลองไม่เสียชีวิต

Nadala, Tapay และ Loh (1997) รายงานว่า yellow-head virus (YHV) เป็นไวรัสที่มีความรุนแรงสูงต่อกุ้ง panaeid เพาะเลี้ยง ซึ่งไวรัสนี้แยกได้มาจากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* จากประเทศไทย โดยในระยะแรกรายงานว่าเป็นไวรัสประเภท baculovirus แต่เพิ่งมีการรายงานขัดแย้งว่าเป็นไวรัสที่มี RNA เป็นองค์ประกอบ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิจัยเพื่อพิสูจน์ในเรื่องดังกล่าว โดยได้ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากกุ้งที่ติดเชื้อโรคหัวเหลือง จากการเหนี่ยวนำด้วยการฉีดเชื้อไวรัสเป็นปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร จาก 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักส่วนด้วยปริมาตรที่ได้จากการเตรียมด้วยอวัยวะส่วนเหงือกของกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ทำการเก็บตัวอย่างใน 3 – 4 วัน และหลังจากนั้นเตรียมเชื้อได้จากส่วนเหงือก, เนื้อเยื่อส่วนหัว และ เลือด ทำการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างด้วยวิธี SDS-PAGE analysis พบโครงสร้างโปรตีนอย่างน้อย 4 โครงสร้าง โดยมีน้ำหนักโมเลกุลที่ 170, 135, 67 และ 22 กิโลดาลตัน และทำวิธี western blot โดยใช้ polyclonal anti – YHV IgG พบการเกิดแถบทั้งหมด 4 แถบ โดยที่น้ำหนักโมเลกุลที่ 135 กิโลดาลตัน มีความเข้มข้นสูงที่สุดและเกิดปฏิกิริยากับ anti – YHV antibodies ขณะที่ anti – YHV IgG นี้ ไม่ทำปฏิกิริยากับโครงสร้างโปรตีนของไวรัสตัวอื่นที่นำมาทดสอบร่วมด้วย อันได้แก่ rhabdovirus of panaeid shrimp (RPS) และ vesicular stomatitis virus (VSV) นอกจากนี้ยังตรวจสอบพบว่าที่น้ำหนัก

โมเลกุลที่ 135 กิโลดาลตัน เป็นสารจำพวก glycosylate จากการทดสอบด้วย Glycoprotein labeling

และนอกจากนี้ยังยืนยันผลว่าเชื้อไวรัสหัวเหลือง หรือ yellow - head virus เป็น unsegment single – strand RNA ที่เป็นสายลบ ขนาดประมาณ 22 คู่เบส จากการที่ตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ RNAse พบว่า แถบ RNA ที่ 22 คู่เบส ยอมรับการย่อยสลายเนื่องจากการใช้เอนไซม์ RNAse และในการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบอนุภาค YHV ที่มีเยื่อหุ้ม มีลักษณะเป็น bacilliform วัดขนาดได้ประมาณ 50 – 60 x 190 – 200 นาโนเมตร ด้านในประกอบด้วย helical nucleocapsid ติดกับเยื่อหุ้มและมีสาย peplomer หรือปุ่มหนาม ยื่นออกโดยรอบ อนุภาคมีความยืดหยุ่นสูงซึ่งสังเกตจากการพบรูปร่างอนุภาคต่าง ๆ ออกไปเป็นจำนวนมากและบางกลุ่มมีการถูกทำลายซึ่งอาจเนื่องจากโครงสร้างแตกหักได้ง่ายเช่นกัน การทดลองสุดท้ายได้นำ yellow – head virus (YHV) และ vesicular stomatitis virus (VSV) ไปทดลองการจับตัวของเม็ดเลือด hemagglutination ที่ได้จากไก่ พบว่าไวรัสทั้ง 2 ชนิดจับตัวกับเซลล์เม็ดเลือดทำปฏิกิริยากันแน่นไม่หลุดออกนานเกิน 24 ชั่วโมง จึงสรุปได้ว่าไวรัสไม่มี receptor ในการทำลายของเอนไซม์ และสุดท้ายให้ข้อสรุปว่าเชื้อไวรัสหัวเหลือง หรือ yellow – head virus มีคุณสมบัติต่าง ๆ เหมือนในไวรัสประเภท rhabdovirusจึงน่าจะจัดอยู่ใน rhabdovirus จนกว่าจะได้ข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติมมากกว่านี้

Chainarong Wongteerasupaya และคณะ (1997) ทำการวิจัยโดยมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ให้มีความแม่นยำ รวดเร็วและสะดวกมากยิ่งขึ้น โดยเตรียมตัวตรวจสอบกรดนิวคลีอิคที่ได้จาก cDNA ซึ่งสกัดจากssRNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง ตัวตรวจสอบที่มีความจำเพาะนี้สร้างขึ้นได้จากการใช้เทคนิค dot – blot hybridization กับกรดนิวคลีอิคที่ได้จากเชื้อโรคหัวเหลืองในกุ้ง,แบคทีเรีย หรือไวรัสอื่น จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ให้ใช้กับปฏิกิริยา RT-PCR ที่ขนาด 135 เบส เพื่อใช้ในการตรวจสอบ RNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง เมื่อนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR กับตัวต้นแบบของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ได้จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสและเชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์ หรือกรดนิวคลีอิคของเชื้อไวรัสหัวเหลือง จึงทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาด 135 เบสตามที่คาดหมาย ในทางตรงข้าม การทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลีอิคของกุ้งปกติหรือกุ้งที่มีเชื้อโรคอื่นๆนั้นไม่ให้ผลผลิตใดๆ ซึ่งผลที่ออกมาชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนถึงความแม่นยำในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ RNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลือง

นอกจากนี้ เทคนิค RT-PCR มีความไวสูงเพราะเนื่องสามารถตรวจได้แม้ใน RNA ปริมาณเพียงเล็กน้อยแค่ 0.01 พิโคกรัม และในแง่ของความรวดเร็วนั้นเทคนิคนี้สามารถตรวจเจอเชื้อไวรัสในเวลาแค่เพียง 6 ถึง 12 ชั่วโมง แต่ในขณะที่เทคนิคของ histopathology จะเห็นผลได้นั้นต้องใช้เวลาตรวจสอบหลังการติดเชื้อ 42 ถึง 48 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นเทคนิค RT-PCR อาจมีประโยชน์ในการตรวจสอบการระบาดของโรคไวรัสหัวเหลืองได้ในระยะแรกที่กุ้งได้รับเชื้อก่อนที่จะเกิดอาการป่วย แต่อย่างไรก็ตาม ในแง่ปฏิบัติและค่าใช้จ่ายที่สูงอาจยังเป็นอุปสรรคในการที่จะนำเทคนิคนี้ไปใช้ปฏิบัติจริง

Spann และคณะ (1997) ได้พบการระบาดของโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* จากแหล่งเพาะเลี้ยงจำนวน 4 ฟาร์ม ในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลียมาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เดือนมกราคม จนถึง มิถุนายน ปี 1996 พบลักษณะไวรัสเป็นรูปแท่ง โดยให้ชื่อว่า gill – associated virus (GAV) โดยพบลักษณะกุ้งที่มีการติดเชื้อมีสุขภาพอ่อนแอ เชื่องช้า ไม่กินอาหาร ว่ายน้ำใกล้กับขอบบ่อบริเวณผิวน้ำ ลำตัว บริเวณข้อต่อ แพนหาง และปากมีสีแดงตั้งแต่สีอ่อนจนถึงเข้ม ส่วนบริเวณเหงือกมีสีเหลืองจนถึงชมพู จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดาพบอวัยวะน้ำเหลืองในกุ้งประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของกุ้งทั้งหมดจากทั้ง 4 ฟาร์ม มีการจัดเรียงตัวแบบผิดปกติ และในจำนวน อวัยวะน้ำเหลือง ที่ผิดปกตินี้ ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ พบบริเวณโครงสร้างท่อที่ถูกทำลาย แต่ไม่พบเซลล์หรือนิวเคลียสที่เป็นลักษณะ hypertrophy ,pyknotic nuclei หรือ การเกิดเซลล์แวคิวโอล และในบริเวณเซลล์ที่เกิดการทำลายของท่อในเซลล์ ประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ นั้นพบ ลักษณะ foci จุดรวมของไวรัสที่ผิดปกติคล้ายกับที่เห็นได้จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส lymphoid organ virus (LOV) แต่จะมีขนาดเล็กกว่าและมีจำนวนมากกว่า และในส่วนนี้ประมาณ 13 เปอร์เซ็นต์ มี foci เห็นได้ชัดเจนและติดสีอิโอซินได้เข้มมาก ส่วนบริเวณเหงือกของกุ้งที่เป็นโรคแสดงให้เห็นการติดรวมกันของปลายซี่เหงือก เกิดการตายของเซลล์ (necrosis) และ เกิดการสูญเสียชั้นผิวนอกของทั้งชั้นแรกและชั้นที่สองของผิวเซลล์ ในส่วนอวัยวะอื่น ได้แก่ ตับและตับอ่อน, เส้นประสาท, หัวใจ, ทางเดินอาหารส่วนกลาง และชั้นผิวหนังมีความปกติในกุ้งตัวอย่างทั้งหมด และจากการตรวจสอบกุ้งที่เป็นโรคด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านในอวัยวะน้ำเหลืองในส่วนไซโตพลาสม พบไวรัส รูปร่างแท่ง มีเยื่อหุ้มไวรัสและมีส่วนของสาย filamental material คล้ายกับ viral nucleocapsid เมื่อสังเกตจากบริเวณท่อที่ถูกทำลายและส่วนที่มีการตายของเซลล์ (necrosis) ในอวัยวะน้ำเหลือง โดยประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์ไวรัสมี nucleocapsid นั้นวัดขนาดได้ 166 – 435 x 16 – 18 นาโนเมตร และในจำนวนน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ พบอนุภาคเซลล์ไวรัสที่มีเยื่อหุ้ม วัดขนาดได้ 183 – 200 x 34 – 42 นาโนเมตร ส่วนในอวัยวะเหงือก นั้นจำนวนประมาณ 40 – 70 เปอร์เซ็นต์มีเซลล์ไวรัสที่มี nucleocapsid และเพียง

แค่ 5 เปอร์เซ็นต์ที่เป็นเซลล์ไวรัสที่มีเยื่อหุ้ม โดยสามารถพบทั้งอนุภาคที่มี nucleocapsid หรือ ที่มีเยื่อหุ้มนั้นอยู่เป็นอิสระในไซโตพลาสม และสามารถที่จะระบุถึงขนาดและลักษณะได้ในอวัยวะน้ำเหลือง นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไปยังกุ้งกุลาดำปกติ โดยคัดแยกเชื้อ GAV จากกุ้งที่ติดเชื้อ ทำการผสมลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งปกติทั้งหมด 42 ตัวที่อยู่ในฟาร์ม พบว่าเกิดการตายภายใน 7 – 8 วันที่เริ่มทำการทดลอง ซึ่งจากการตรวจสอบด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่ากุ้งปกติที่ได้รับเชื้อ GAV นั้น จะเข้าทำลายที่ อวัยวะน้ำเหลือง และ ส่วนเหงือก จากการวิเคราะห์ทางลักษณะโครงสร้างและรูปร่างของไวรัส และทางพยาธิวิทยา ของ gill – associated virus สามารถสรุปได้ว่ามีความคล้ายคลึงกันกับ lymphoid organ virus (LOV) จากประเทศออสเตรเลีย และ yellow – head virus (YHV) จากประเทศไทย ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาในส่วนข้อมูลทางโมเลกุลเพิ่มเติมเพื่อที่จะสามารถหาความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกันได้ และสามารถจัดหมวดหมู่ไวรัสทั้ง 3 ชนิดนี้ ได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

Nunan, Poulos และ Lightner (1998) ทำการวิจัยสืบเนื่องมาจากขณะนี้พบการส่งผ่านเชื้อโรคข้ามประเทศเกิดขึ้นบ่อยครั้ง ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากการโยกย้ายคน สัตว์ หรือสิ่งของต่างๆ โดยอาจปนเปื้อนมาทางพื้นดิน น้ำทะเล ทางอากาศ หรือทางเรือ ตัวอย่างเช่นการส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง จึงทำการวิจัยการมีอยู่ของไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสหัวเหลือง (YHV) จากผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งที่นำเข้าสหรัฐอเมริกามาจากทางแถบประเทศในเอเชีย โดยทดลองการนำสารที่สกัดมาจากกุ้งกุลาดำแช่แข็ง *P.monodon* ที่แสดงอาหารดวงขาวบริเวณหางมาฉีดให้แก่กุ้งทดลอง *P.stylirostris* ซึ่งเป็นกุ้งที่เลี้ยงภายในประเทศสหรัฐอเมริกา ผลที่ได้พบการตายสะสมถึง 100 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 8 วัน เมื่อนำกุ้งทดลองมาตรวจสอบทาง bioassay และ histopathology ผ่านกล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดาพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองอย่างรุนแรง มีการตายของเซลล์และลักษณะนิวเคลียสที่พบเกิด karyorhexis และ pyknosis ในส่วนอวัยวะที่ได้รับผลกระทบจากไวรัสนั้นก็คือ อวัยวะน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เซลล์พิลลา (pillar) เซลล์เยื่อบุผิวของส่วนเหงือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นเนื้อเยื่อยึดใต้ต่อผิวหนัง กล้ามเนื้อ ทางเดินอาหาร antennal gland อวัยวะสืบพันธุ์ เส้นประสาท และปมประสาท และเมื่อตรวจลักษณะไวรัส พบอนุภาคไวรัสขนาดใหญ่มีหนามปุ่มปมยื่นออกมาจากเยื่อหุ้ม วัดความยาวอนุภาคไวรัสขนาดใหญ่ได้ 155 – 210 นาโนเมตร (โดยเฉลี่ย 170 นาโนเมตร) เส้นผ่านศูนย์กลาง 26 – 54 นาโนเมตร (โดยเฉลี่ย 38 นาโนเมตร) ส่วนผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR แสดงถึงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเช่นกัน ผลการศึกษาครั้งนี้ สามารถบ่งชี้ความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดส่งผ่านไวรัส YHV และ WSSV จากการนำเข้ากุ้งที่มีเชื้อดังกล่าวจากแถบประเทศเอเชียมาสู่ประเทศสหรัฐอเมริกา เพราะเนื่องจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ความเป็นจริงนั้นแล้วจะพบแค่ใน

แถบประเทศทางตะวันออก แต่ขณะนี้ได้พบการระบาดของเชื้อตัวแดงดวงขาวในประเทศสหรัฐอเมริกา

Peng และคณะ (1998) ทำการศึกษากลไกการติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ *P.monodon* โดยใช้การสังเกตจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นหลัก ซึ่งลักษณะการติดเชื้อระยะแรก pre – patent state ในกุ้งนั้นไม่พบอาการของโรคตัวแดงดวงขาว กุ้งยังมีสภาพแข็งแรงดำรงชีวิตได้ปกติ ถึงแม้ว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อตัวแดงดวงขาวที่ยังคงอยู่ในระยะ pre – patent state นั้นอยู่ได้เป็นเวลานานหลายเดือน แต่อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ทันทีภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงเมื่อมีความเครียดเกิดขึ้น ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาการเพิ่มความเครียดแก่กุ้งกุลาดำโดยการดึงขาว่ายน้ำออกทีละข้างทุกๆวัน และนำไปวิเคราะห์ผลของจำนวนไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยวิธี PCR จาก DNA ที่สกัดจากขาว่ายน้ำนั้นๆ ซึ่งพบจากเดิมเริ่มต้นได้เป็นผลบวกใน 2-step PCR จนต่อๆมาพบการเพิ่มของจำนวนไวรัสจนได้ผลบวกในขั้นตอน 1-step PCR ในระยะเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง หลังเพิ่มความเครียดแก่กุ้งทดลอง นอกจากนี้ทำการยืนยันผลโดยนำตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ผลบวกในขั้นตอน 1-step PCR นั้น ทำการวิเคราะห์ด้วย *in situ* hybridization พบว่ามีการติดเชื้อตามอวัยวะต่างๆได้แก่ กระเพาะอาหาร ผิวหนัง หัวใจ antennal gland อวัยวะน้ำเหลือง ตับและตับอ่อน และกล้ามเนื้อ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ความเครียดสามารถทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและเกิดการแพร่กระจายไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว

Tang และ Lightner (1999) ได้ศึกษาเตรียมโคลนจาก cDNA ของเชื้อไวรัสหัวเหลืองเพื่อจะนำไปเป็นตัวตรวจสอบสำหรับเทคนิค *in situ* hybridization โดยชิ้นส่วน cDNA นั้นมีขนาด 1161 คู่เบส ให้ชื่อโคลนว่า 3 – 27 นำติดฉลากด้วย digoxigenin แล้วนำไปใช้ในเทคนิค *in situ* hybridization ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อของกุ้ง *Penaeus vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง พบว่าเกิดปฏิกิริยาผลบวกกับเนื้อเยื่อรวมไปถึงอวัยวะน้ำเหลือง ชั้นผิวหนังชั้นนอก และเหงือก นอกจากนั้นยังมี เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับอ่อน หัวใจ antennal gland อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เส้นประสาท ลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง และกล้ามเนื้อ ที่เกิดปฏิกิริยากับตัวตรวจสอบ ตัวตรวจสอบนี้นับว่ามีความจำเพาะสูงกับเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากไม่ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อกุ้งที่ไม่มีไวรัส หรือกุ้งที่มีเชื้อไวรัสชนิดอื่นเช่นไวรัสตัวแดงดวงขาว IHHNV(Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus) หรือ TSV (Taura Syndrome virus) เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนและสังเคราะห์ไพรเมอร์ จะสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากตัวอย่างเลือดได้จากเทคนิค RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

ดังนั้น สายstrand ที่สามารถสร้างเป็นลำดับ cDNA นั้นได้จากการใช้เทคนิค RT-PCR และ *in situ* hybridization โดยมีตัวตรวจสอบเป็น RNA สายเดี่ยว (ssRNA)

Cowley และคณะ (1999) ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนกันของบริเวณหน่วยพันธุกรรม จากการแยกจีโนมของเชื้อไวรัสหัวเหลือง หรือ yellow – head virus (YHV) จากประเทศไทย และ gill – associated virus (GAV) จากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งใช้วิธีการตรวจสอบทาง RT-PCR และการวิเคราะห์ลำดับ (sequence analysis) โดยได้กำหนดลำดับ PCR primer จากส่วน ORF1b polyprotein gene ของเชื้อไวรัส GAV พบว่ามีความสัมพันธ์ตรงกันกับลำดับจีโนม ของเชื้อไวรัส YHV ทั้งหมด 577 นิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบจากบริเวณที่เกิดการเพิ่มขึ้น (amplify) ในลำดับที่ตรงกันของส่วนนิวคลีโอไทด์ มีประมาณ 85.1 เปอร์เซ็นต์ และส่วนลำดับกรดอะมิโน มีประมาณ 95.8 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเปรียบเทียบการรายงานผลของคณะวิจัยอื่นก่อนหน้านี้ซึ่ง ได้กำหนด YHV PCR primer ในการเพิ่มผลผลิต ได้ผลผลิต 135 นิวคลีโอไทด์ เมื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองพบว่าไม่สามารถเพิ่มผลผลิตที่ตรงกันกับเชื้อไวรัส GAV ได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยอื่นที่ทำการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัส GAV และ YHV ตรงบริเวณเหนือขึ้นไปจากยีน ORF1b พบว่าในส่วนระดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันถึง 83 และ 80.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ระดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกัน 89.7 และ 86.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อไวรัส gill – associated virus และ yellow – head virus มีความคล้ายคลึงกันแต่เป็นไวรัสคนละชนิดซึ่งสามารถพัฒนาตัวตรวจสอบตรวจจากความต่างกันนี้ได้

Nadala และ Loh (2000) ได้ทำการพัฒนาตรวจสอบการติดเชื้อ white – spot syndrome virus (WSV) และ yellow – head virus (YHV) ในกุ้ง โดยวิธี dot – blot nitrocellulose enzyme immunoassay (DB – NC – EIA) การทดลองได้นำชิ้นเหงือกของตัวอย่างกุ้ง *Penaues vannamei* ที่ติดเชื้อไวรัส WSV และ YHV มาบด โดยเชื้อที่คัดแยกมาเหนี่ยวนำนั้นได้จากประเทศต่าง ๆ ได้แก่ จีน อินโดนีเซีย และสหรัฐอเมริกา ในประเทศญี่ปุ่นนั้นได้คัดเชื้อแยกมาจากฟาร์มของกุ้ง *Penaeus japonicus* จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดที่ได้ หยดลงบนแผ่น nitrocellulose membrane (NC) 2 ไมโครลิตร ต่อหนึ่งหยด แล้วถ่ายลงบน polystyrene tube บ่มด้วยสารละลาย blocking ซึ่งเป็นนมผงพร่องมันเนย 5 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และให้ทำปฏิกิริยากับ anti – WSV IgG – HRP และ anti – YHV IgG – HRP ซึ่งผลิตได้จากกระต่าย ทั้งหมด 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงให้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรต TMB (3,3',5,5' – tetramethylbezidine) เป็นเวลา 3 นาที จึงอ่านผล พบจุด blot ของตัวอย่างเหงือกกุ้งที่ติดเชื้อบน

แถบเซลลูโลส ทั้ง WSV และ YHV แบบเจือจาง 1 : 10 และไม่ได้เจือจาง ส่วนในตัวอย่างควบคุมไม่เกิดผล นอกจากนี้พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกันระหว่าง anti – WSV IgG – HRP กับตัวอย่างเหงือกกุ้งที่ติดเชื้อ YHV และในทางกลับก็ไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่าง anti – YHV IgG – HRP กับตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อ WSV เช่นกัน และการทดสอบในกุ้งที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อไวรัสที่คัดแยกจากประเทศอื่น ๆ นั้น ผลที่ได้เป็นบวกทั้งหมด ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า การใช้เทคนิค dot – blot nitrocellulose enzyme immunoassay (DB – NC – EIA) เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ white – spot syndrome virus และ yellow – head virus มีความแม่นยำว่องไว และง่าย ทราบผลเพียงแค่ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งจากผลที่ได้แสดงถึงความไวต่อปฏิกิริยาในขณะที่ได้เจือจางตัวอย่างไป 10 เท่า ซึ่งเท่ากับว่าสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในกุ้งได้ในขณะที่กุ้งนั้นเพิ่งได้รับเชื้อและยังไม่แสดงอาการ

Cowley และคณะ (2000) ได้นำวิธี reverse transcription ที่มีความไวในการตรวจสอบสูง หรือที่เรียกว่า nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) มาตรวจสอบการติดโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* จากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งได้แก่โรค yellow – head – like viruses, gill – associated virus (GAV) และ lymphoid organ virus (LOV) จากการทดลองพบว่า เทคนิค RT – nPCR สามารถตรวจ RNA ในไวรัส GAV ในจำนวนเพียงแค่ 10 พิโคกรัมจากปริมาณ RNA ที่สกัดได้จากอวัยวะส่วนอวัยวะน้ำเหลืองในกุ้งกุลาดำ และสามารถเพิ่มจำนวนชุดโคลน cDNA ของเชื้อ GAV ซึ่งแสดงให้เห็นถึง nested PCR มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะตรวจสอบจีโนมโดยใช้ DNA ต้นแบบ นอกจากนี้ในการทดลองได้แสดงผลของ RT – nPCR ในแง่ของความจำเพาะและความไวสูงต่อการตรวจสอบการติดเชื้อ GAV ในกุ้ง *Penaeus japonicus* โดยลำดับจีโนมเชื้อไวรัส GAV สามารถทำการเพิ่มจำนวน RNA ในส่วนที่มาจากอวัยวะน้ำเหลือง และเม็ดเลือดที่เวลา 6 ชั่วโมง และจากอวัยวะเหงือกที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดเหนี่ยวนำเชื้อไวรัสในกุ้ง แต่จากการสังเกตจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบส่วนของ nucleocapsid และ อนุภาคไวรัสในเซลล์อวัยวะ อวัยวะน้ำเหลือง และเซลล์เม็ดเลือดตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 6 หลังการฉีดเชื้อไวรัสเหนี่ยวนำตามลำดับ ขณะที่ไม่พบการติดเชื้อในเซลล์เหงือก นอกจากนี้ได้ทำการทดลองนำเทคนิค RT – nPCR มาใช้คัดแยกกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ปกติไม่เป็นโรคจากการจับจากธรรมชาติ โดยผลพบว่าส่วนใหญ่กุ้งที่ตรวจนั้นมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ของกุ้งทั้งหมด ให้เป็นผลบวก ซึ่งอาจเนื่องมาจาก ตรวจพบเชื้อไวรัส LOV ซึ่งเชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นเชื้อไวรัสที่ไม่ก่ออันตรายซึ่งแปรผันไปจากเชื้อไวรัส GAV และเชื้อไวรัส LOV เป็นเชื้อที่พบเป็นปกติโดยเฉพาะในแถบบริเวณรัฐควีนส์แลนด์เหนือ ประเทศออสเตรเลีย สุดท้าย ได้เสนอแนะการนำอวัยวะมาใช้ทดสอบจากRNA ซึ่งได้แก่ ส่วนของ อวัยวะน้ำเหลือง, เหงือก และ

เม็ดเลือด นั้น ควรที่จะใช้ส่วนของเนื้อเยื่อชิ้นเหงือกเล็กๆมาตรวจ เนื่องจากไม่ต้องทำให้สัตว์ทดลองนั้นตาย จากการทดลองจึงสามารถสรุปได้ถึงประโยชน์ในการนำเทคนิค RT – nPCR มาตรวจสอบไวรัส LOV และ GAV ในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ได้ โดยไม่ต้องนำวิธีตรวจด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านมาใช้ร่วมด้วย และยังให้ประโยชน์ในการคัดเลือกกุ้งที่จะนำมาเพาะพันธุ์โดยปราศจากเชื้อไวรัส LOV

Sithigorngul และคณะ (2000) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลือง (YHV) จากหนูที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยสารสกัดจากเหงือกของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้โคลนชื่อว่า V3-2 B ซึ่งสามารถจับโปรตีนของไวรัสหัวเหลืองที่อยู่ในสภาพปกติหรือถูกให้เสียสภาพด้วย SDS เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิคทาง immonohistochemistry กับตัวอย่างชิ้นเหงือกของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ได้รับเชื้อหัวเหลือง พบว่าแอนติบอดีนี้สามารถจับทำปฏิกิริยาในส่วนไซโตพลาสมของชิ้นเหงือกและในส่วนของเม็ดเลือด โดยไม่มีการทำปฏิกิริยากับชิ้นเหงือกจากกุ้งปกติ นอกจากนั้น เมื่อนำเทคนิคนี้มาทดสอบกับเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองก็ให้ผลบวกของการเข้าทำปฏิกิริยา ในขณะที่เนื้อเยื่อกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง หรือกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวนั้นไม่เกิดปฏิกิริยา และนอกจากนี้ยังได้นำไปวิเคราะห์ผลใน Western Blot พบว่าแอนติบอดีนี้สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 135 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจะพบได้ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเท่านั้น และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot-blot indirect immunoperoxidase assay พบว่า แอนติบอดีนี้สามารถตรวจสอบแอนติเจนไวรัสหัวเหลืองจากการเจือจางเลือดกุ้งได้มากถึง 1 : 50 และในเลือดที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้ถึง 1:1000 ผลสรุปของการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ในกุ้งที่ติดเชื้อตั้งแต่ระยะแรกจนถึงติดเชื้ออย่างรุนแรงได้

Sithigorngul และคณะ (2002) ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ capsid protein ของไวรัสหัวเหลืองที่ขนาด 22 , 67 และ 135 กิโลดาลตัน จากการทดลองฉีด heamolymph ที่บริสุทธิ์จากกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้แก่หนูขาว จากการทดลองแยกกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ทั้งหมดสี่กลุ่ม โดยแอนติบอดีกลุ่มที่หนึ่งสามารถจับโปรตีนที่อยู่ในสภาพปกติได้เท่านั้น ต่างจากอีกสามกลุ่มที่เหลือที่สามารถจับกับโปรตีนที่อยู่ในสภาพปกติหรือถูกทำให้เสียสภาพก็ได้ โดยในโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่สองสามารถจับกับโปรตีนขนาด 135 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติคล้ายกับแอนติบอดีชนิด V 3 – 2B ที่ได้เคยผลิต

มาแล้ว ในกลุ่มที่สามเป็นแอนติบอดีที่พบมากที่สุดสามารถแยกได้ถึง 13 โคลนจากทั้งหมด 21 โคลน สามารถจับโปรตีนที่ขนาด 67 และ 140 กิโลดาลตัน ในกลุ่มสุดท้าย กลุ่มที่สี่ประกอบด้วยโมโนโคลนอล 2 ชนิดสามารถจับกับโปรตีนที่ขนาด 22 กิโลดาลตัน โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งสี่กลุ่มนี้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำได้จากการทำ dot blot และ immunohistochemistry จากผลการทดลองพบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 22 กิโลดาลตัน นั้นให้ผลของการทำ immunohistochemistry ได้ดีที่สุดในแง่ของความเข้มและความคมชัดจากการย้อมสี

Nusra Sittidilokratana และคณะ (2002) ทำการรายงานถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งหมด 8503 นิวคลีโอไทด์ในบริเวณจีโนมของเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่มีส่วนของตำแหน่งยีน ORF 1b โดยเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับจีโนมของไวรัส gill – associated virus (GAV) พบว่ามีจีโนมลักษณะเดียวกันกับไวรัสหัวเหลืองประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และไวรัสหัวเหลืองมีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับไวรัส gill-associated virus ถึง 88.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าไวรัสหัวเหลืองมีสารจำพวก polymerase , metal ion binding , helicase และ domail อื่น ๆ จากการพิจารณาคุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้จึงเห็นพ้องว่า ไวรัสหัวเหลืองจัดอยู่ไวรัสจำพวก genus nidovirus และจากข้อมูลตรวจสอบทางพันธุกรรมการเรียงตัวในลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น ไวรัสหัวเหลืองควรจัดอยู่ใน order *Nidovirales* และจากหลักฐานทางชีววิทยาและการวิเคราะห์จากตำแหน่งต่าง ๆ ที่ไวรัสอยู่ในเซลล์ จึงทำให้ทราบว่า YHV และ GAV นั้นไม่ได้เป็นชนิดเดียวกัน

Kornnika Khanobdee และคณะ (2002) ทำการศึกษาพิสูจน์การเกิดเหตุการณ์ apoptosis ในกุ้งที่เป็นผลมาจากการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง yellow – head virus (YHV) ซึ่งได้ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงทาง histological , cytochemical และ ultrastructure จากส่วนของเม็ดเลือด , อวัยวะน้ำเหลือง และส่วนเหงือก ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ในหลายช่วงเวลาหลังจากฉีดเหนี่ยวนำด้วยไวรัสหัวเหลือง พบกุ้งเริ่มแสดงอาการป่วยให้เห็นเป็นระยะต่อมาเริ่มจากที่ชั่วโมงที่ 36 เมื่อย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยฮีมาทอกไซลิน และอิโอซิน สังเกตเห็นในทั้ง 3 เนื้อเยื่อดังกล่าวมีการเพิ่มความหนาแน่นของนิวเคลียส , pyknosis และ karyorrhexis หลังจากฉีดไปแล้ว 36 ชั่วโมง จนกุ้งตาย แต่อย่างไรก็ตามในกุ้งบางตัวแสดงอาการของโรคให้เห็นและตรวจพบไวรัสในอวัยวะน้ำเหลือง ได้ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 12 หลังการฉีดเหนี่ยวนำด้วยไวรัส จากนั้นได้ทำการทดลองย้อม DNA ด้วย สาร 4',6 – diamidino – 2 phenylindole (DAPI) และติดฉลากอย่างจำเพาะด้วย 3 ' – OH ends of nuclear DNA โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated deoxy – UTP nick – end labeling (TUNEL) โดยเซลล์ของทั้ง 3

I22142186

เนื้อเยื่อแสดงถึงโครมาตินที่หนาแน่นและ DNA มีการแตกหักตามลำดับ ซึ่งสันนิษฐานว่าทั้ง 2 เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นมาจากการเกิด apoptosis ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการเกิด apoptosis นอกจากนี้จากการติดฉลากของเทคนิค TUNEL นั้น ทำให้สามารถเห็นการแตกของ DNA ประมาณ 200 คู่เบส ในตัวอย่างเลือด ที่เวลาชั่วโมงที่ 48 หลังการฉีดเหนี่ยวนำเชื้อไวรัสหัวเหลือง แต่ไม่สามารถเห็นในกุ้งที่ไม่เกิดการติดเชื้อ เมื่อตรวจสอบอวัยวะน้ำเหลือง ด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน จะเห็นการเกิด apoptosis ในเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ รวมไปถึงการเกิดภาวะอักเสบ การรวมกันหนาแน่นและแตกตัวของโครมาติน โดยไม่มีการทำลายส่วนของไซโตพลาสม และจากข้อมูลที่ตรวจสอบอันได้แก่ ข้อมูลทาง histology , cytochemical , ultrastructure และ biochemical พบว่าตรงกับสมมติฐานว่าการแพร่กระจายและการขยายตัวของเหตุการณ์ apoptosis เกิดขึ้นกับกุ้งที่มีความอ่อนแอโดยเนื่องจากได้รับเชื้อโรคไวรัสหัวเหลือง แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการตรวจสอบที่สามารถระบุได้ว่าเหตุการณ์ apoptosis นั้นเป็นสาเหตุทำให้เกิดอันตรายและก่อให้เกิดอาการป่วยในกุ้ง โดยเพิ่มความเสื่อมของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในได้แก่ เม็ดเลือด , เหงือก และ อวัยวะน้ำเหลือง มีผลทำให้การทำงานของร่างกายอยู่ในภาวะอันตราย และมีอาการภายนอกให้เห็นเช่นการเซื่องซึม อ่อนแอ ตามมาด้วยการเสียหายในระบบการทำงานภายในและตามมาด้วยการตายในที่สุด

Cowley และคณะ (2002) ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส chronic gill – associated virus (GAV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ระบาดในกุ้งกุลาดำที่จับจากธรรมชาติ และกุ้งกุลาดำเลี้ยง พบที่รัฐควีนส์แลนด์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประเทศออสเตรเลีย งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค reverse transcription (RT) – nested PCR มาใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสจากถุงหุ้มอสุจิ , จากเนื้อเยื่อรังไข่กุ้งที่เลี้ยงในฟาร์ม และรวมถึง ตรวจจากไข่ที่รับการผสมและตัวอ่อนที่เกิดจากแม่กุ้งจากในธรรมชาติ จากการนำกุ้งมาทดลองเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ พบ กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* อายุมากกว่า 12 เดือน มีอัตราการตายสูง จึงได้นำกุ้งเพศผู้ไปตรวจสอบด้วย RT – neasted PCR พบปริมาณไวรัส GAV ในส่วนของถุงอสุจิเป็นระดับที่มากกว่าในส่วนของอวัยวะน้ำเหลือง และจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบอนุภาคไวรัส GAV ในน้ำเลี้ยงอสุจิแต่ไม่พบที่ตัวเซลล์อสุจิ จากนั้นได้นำอวัยวะน้ำเหลือง ของกุ้งกุลาดำน้ำหนัก 1.2 กรัมที่ยังไม่โตเต็มที่จากฟาร์มแห่งหนึ่ง ทำการตรวจ histology พบเซลล์ hypertrophied cell foci หรือ spheroids รวมทั้งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบ nucleocapsid และอนุภาคของเชื้อไวรัส GAV ในเซลล์ spheroid หลังจากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำการตรวจ PCR ทั้งพ่อและแม่กุ้งกุลาดำและไข่ที่ได้รับการผสม พบว่าเชื้อไวรัส GAVที่ติดต่อไปยังไข่นั้นแท้จริงมาจากทั้งพ่อและแม่กุ้ง ถึงแม้ว่าจีโนไทด์ GAV ในแม่กุ้งจะมีอิทธิพลต่อการถ่ายทอดไปยัง

ไข่ แต่แท้จริงนั้นขึ้นกับระดับความรุนแรงของการติดเชื้อในทั้งพ่อและแม่กุ้งซึ่งทราบได้จากผลของ RT – PCR จากข้อมูล RT – nested PCR ที่ตรวจพบ ได้ระบุถึงระดับเชื้อไวรัส GAV ในไข่ และตัวอ่อนกุ้งในระยะต่าง ๆ ที่เกิดจากการจับคู่พ่อแม่กุ้งในห้องปฏิบัติการ ทำให้ทราบว่าการถ่ายทอดไวรัสจากพ่อและแม่สู่รุ่นลูกนั้นสามารถติดต่อได้ทางผิวของไข่

2.5 การศึกษาที่เกี่ยวกับพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลือง

พาหะนำโรคไวรัสเป็นสาเหตุสำคัญในการแพร่ระบาดของไวรัส ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกการถ่ายทอดเชื้อไวรัสและวินิจฉัยพิสูจน์ถึงสัตว์ชนิดใดที่สามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสได้จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นจะต้องศึกษาเพื่อเป็นความรู้แนวทางการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัส ซึ่งจำนวนรายงานที่พบนั้นส่วนมากเป็นการศึกษาในเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

Lo และคณะ (1996) พบว่าเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถถ่ายทอดไปในกุ้งได้หลายชนิดและพบได้ในหลายประเทศทั่วเอเชีย ในการตรวจพบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งนี้ได้ใช้วิธี 1-step PCR reaction และยังได้พัฒนาไปเป็น 2-step PCR ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบวินิจฉัยที่สูงยิ่งขึ้นไปอีกโดยประมาณ 10^3 ถึง 10^4 เท่าเมื่อเทียบกับวิธี 1-step PCR โดยเทคนิคทั้งสองนี้ได้นำมาใช้ตรวจหา DNA ของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งที่เพาะเลี้ยงและกุ้งจากธรรมชาติ รวมถึงสัตว์จำพวกปูและอาร์โทรปอดอื่นๆ ซึ่งผลที่ได้ พบกุ้งเพาะเลี้ยงได้แก่กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* กุ้งคูรูมา *Metapenaues japonicus* กุ้งหางแดง *Penaeus penicillatus* และกุ้งตะกาด *Metapenaues ensis* ที่เพาะจากแหล่งต่าง ๆ กันนั้นติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เมื่อวิเคราะห์ DNA ที่สกัดจากกุ้งที่รวบรวมได้ด้วยวิธี 1-step PCR พบว่าให้ชิ้นส่วนยีน 1447 PCR ส่วนตัวอย่างในปูทะเล *Scylla serrata* พบการติดเชื้อตัวแดงดวงขาวที่ 1-step PCR ส่วนในบางกลุ่มและส่วนที่เหลือให้ผลของ 2-step PCR และนอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ผลการตรวจ DNA ในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* ที่มีอาการโรคตัวแดงดวงขาวได้ผลบวกใน 2-step PCR เช่นเดียวกัน และสุดท้ายผลการทดลองยังได้ยืนยันการมีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในธรรมชาติจากกุ้งที่จับมาอันได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งคูรูมา กุ้งหางแดงและปูต่าง ๆ ได้แก่ ปูกางเขน *Charybolis feriatus* ปูม้า *Portunus pelegicus* และปูสามจุด *P. sanguinolentus* ทั้งหมดที่รวบรวมได้จากแถบชายฝั่งทะเลทางประเทศใต้หวัน นอกจากนี้ยังตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาวในอาร์โทรปอดที่มีอยู่ในฟาร์มกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวพบว่าไรน้ำกลุ่ม copepod pest crab *Helice tridens*

,small pest ของกุ้งครอบครัว Palaemonidae และตัวอ่อนของแมลงจำพวก Ephydridae เป็นแหล่งสะสมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยอาจถ่ายทอดเชื้อสู่ฟาร์มกุ้งกุลาดำได้

Panan Kanchanaphum และคณะ (1998) ศึกษางานวิจัยถึงความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของปู 3 ชนิด ที่พบตามบ่อกุ้งทั่วไป อันได้แก่ *Sesarma* sp., ปูทะเล *Scylla serrata* และ ปูก้ามดาบ *Uca pugilator* ไปสู่กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดยการทดลองเหนี่ยวนำไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยการฉีดให้แก่ปูทดลองทั้งหมด ผลที่ได้พบว่าสัตว์ทดลองสามารถทนต่อไวรัสโดยไม่มีอาการของโรคปรากฏให้เห็นหรือมีการตายเกิดขึ้นตลอดช่วง 45 วันของการทดลอง ซึ่งขั้นตอนนี้ตรวจสอบด้วยผลของ histology , specific *in situ* DNA hybridization และเทคนิคทาง PCR หลังจากนั้นนำเอาปูทั้งหมดที่มีเชื้อไวรัสไปเลี้ยงรวมกันกับกุ้งกุลาดำ *P.monodon* ที่ปกติ พบการถ่ายทอดไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำได้ โดยผ่านทางน้ำที่เลี้ยงอยู่ในบ่อเดียวกัน การถ่ายทอดไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำตรวจพบได้ด้วยวิธี *in situ* hybridization และเทคนิค PCR หลังจากที่นำไปเลี้ยงรวมกันรวมทั้งหมด 12 ชั่วโมง สำหรับปูทะเล *Scylla serrata* เกิดการถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำได้ ซึ่งตรวจพบโดยเทคนิค PCR หลังระยะเวลาที่อยู่ร่วมกัน 24 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 60 ชั่วโมง ในปูทะเล *Scylla serrata* ตรวจจากเทคนิค PCR พบที่เวลา 48 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 60 ชั่วโมง และในปูแสม *Sesarma* sp. ตรวจจากเทคนิค PCR พบที่เวลา 48 ชั่วโมง และวิธี *in situ* hybridization ที่เวลา 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษา เป็นการจำลองสถานการณ์ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากพาหะนำโรคไปสู่กุ้งกุลาดำซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในบ่อกุ้ง แต่อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้มีปัจจัยของจำนวนสัตว์ทดลองที่น้อยกว่าจริงและน้ำทะเลที่ใช้นั้นมีความสะอาดกว่าบ่อเลี้ยงจริงอยู่มาก ซึ่งตรงปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลทำให้อัตราการถ่ายทอดของเชื้อไวรัสนั้นเปลี่ยนแปลงไป จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษากันต่อไปถึงปัจจัยของขนาดบ่อเพาะเลี้ยง คุณภาพน้ำ และพฤติกรรมการอยู่ร่วมกันในบ่อกุ้งที่เป็นสถานที่จริง

Kidchakan Supamattaya และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวของสัตว์จำพวก crustacean ที่อาศัยตามบ่อเพาะเลี้ยงกุ้ง อันได้แก่ ปูม้า *Portunus pelegicus* ปูทะเล *Scylla serrata* และ เคย *Acetes* sp. รวมไปถึงศึกษาถึงผลกระทบของการรับเชื้อไวรัสดังกล่าวด้วย สำหรับการทดลองนั้น ได้นำสารสกัดจากเหงือกกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากแหล่งธรรมชาติ โดยยืนยันผลการติดเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพื่อนำไปเป็นสารเหนี่ยวนำในการทดลองสองประเภท คือ การฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองและนำไปผสมในน้ำที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง ส่วนเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสนำไปทดลองการรับเชื้อไวรัสจาก

การกิน ในการตรวจสอบผลจะใช้วิธี histology ,electron microscopy และ *in situ* hybridization ซึ่งปรากฏผลออกมาว่าสัตว์ทดลองทั้ง 3 ชนิดสามารถรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ ในเคยนั้น การฉีดไวรัสส่งผลกระทบมากที่สุดทำให้ตายได้ทั้งหมดในเวลา 3 วัน ส่วนการเลี้ยงในน้ำที่มีเชื้อไวรัสส่งผลให้ตายทั้งหมดภายในเวลา 5 วัน และการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อตายแค่เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนทั้งหมดใน 9 วัน สำหรับในปูนั้น การฉีดไวรัสส่งผลกระทบมากที่สุดเช่นกัน ในปูม้าพบการตายทั้งหมดภายในเวลา 8 วัน แต่ในปูทะเลนั้นตายเพียงแค่ 20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนทั้งหมดในเวลา 9 วัน และการทดลองกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ พบว่า ไม่มีการตายของปูทั้ง 2 ชนิดในตลอดเวลา 9 วันที่ทดลอง ถึงแม้ว่าจะมีการยืนยันผลของการติดเชื้อแล้วด้วยวิธีทาง histology ดังนั้น จากผลการศึกษาจึงได้สรุปว่า ปูและเคยบางชนิดสามารถพิจารณาให้เป็นแหล่งของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เนื่องจากสามารถรับเชื้อไวรัสและยังดำรงชีวิตอยู่ได้ตามบริเวณฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้ง

Hameed , Charles และ Anilkumar (2000) ศึกษาการรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งน้ำจืด 3 ชนิด คือ *M.idella* , *M. lamerrae* และ *M.rosenbergii* นำมาเปรียบเทียบผลกับในกุ้งน้ำเค็ม 2 ชนิด คือ *P.indicus* และ *P.monodon* โดยทดลองด้วยการจุ่มแช่ในน้ำที่เลี้ยงผสมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว , การให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และ การฉีดสารสกัดจากกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จากนั้นบันทึกการตายสะสมของสัตว์ทดลอง พบการตายในกุ้ง *M. lamerrae* และ *M.idella* จากการแช่จุ่ม เป็น 43.3 เปอร์เซ็นต์ และ 53.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ จากการกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัส เป็น 53.3 เปอร์เซ็นต์ และ 66.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ การตายเป็น 100 เปอร์เซ็นต์จากการฉีดด้วยไวรัสในกุ้ง *M.idella* , *M. lamerrae* , *P.indicus* และ *P.monodon* โดยจากผลการตายนั้นนำตรวจด้วยวิธี Western blot และ histopathologyพบว่าเป็นการตายที่เกิดจากไวรัสตัวแดงดวงขาว เว้นแต่ *M.rosenbergii* เท่านั้นที่ไม่มีอาการของโรคและการตายเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาที่ทดลอง 15 วัน

Chen และคณะ (2000) ทำการศึกษาการนำเทคนิค PCR และเทคนิค in *situ* hybridization มาตรวจพิสูจน์หาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในตัวอ่อนของปูทะเล *Scylla serrata* จากการจับจากธรรมชาติบริเวณชายฝั่งทะเลตอนใต้ของประเทศไต้หวัน ส่วนหนึ่งที่นำมาตรวจมาจากวันแรกของการจับ พบ 60 เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนปูทะเลมีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ต่อจากนั้นนำส่วนที่เหลือทั้งหมดไปเลี้ยงในบ่อเป็นเวลา 14 วัน และนำตัวที่ตายในแต่ละวันทำการตรวจ ผลที่ได้พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวซึ่งยังคงอยู่ที่ปริมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนปูทะเลทั้งหมด นอกจากนี้ยังได้ใช้เทคนิคดังกล่าวตรวจสอบกับปูทะเลที่ปราศจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว และ

นำมาเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อด้วยการแช่จุ่มในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือจางอยู่ในปริมาณ 1:50 โดยเชื้อไวรัสนี้เตรียมจากแผ่นแก้มปิดเหงือกและเปลือกหุ้มลำตัวของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอย่างรุนแรงซึ่งให้ผลบวกใน 1-step PCR นำมาบดกับน้ำทะเลที่ปลอดเชื้อปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผ่านขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงและกรอง ส่วนในกลุ่มควบคุมจะเตรียมสารด้วยวิธีการเดียวกันแต่จะใช้แผ่นแก้มปิดเหงือกและเปลือกหุ้มลำตัวจากกุ้งที่ตรวจ PCR ที่ให้ผลเป็นลบ ที่ 2-step PCR นำไปเจือจางผสมในน้ำเช่นกัน จากการทดลองนำตัวอ่อนปูทะเลแช่ในน้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเจือจางเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาเลี้ยงในน้ำตามปกติเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลปูทะเลที่ตายแต่ละวันด้วยวิธีการ 2-step PCR พบปริมาณอัตราการตายสะสมสูงถึง 43 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการตายสะสมเพียงแค่ 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น จากการตรวจวินิจฉัยไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วยเทคนิค PCR ทั้งในปูทะเลที่มีอาการของโรคและปูที่ยังไม่ตายให้ผลชัดเจนว่าไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นสาเหตุของการตายในตัวอ่อนปูทะเล และในการทดลองได้คัดเลือกปูที่แช่น้ำที่มีเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากตัวอย่างปูที่ป่วยในกลุ่มต่างๆตามเวลาต่างๆ มาศึกษา histology และ *in situ* hybridization ผลที่ได้แสดงถึงการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเกิดขึ้นที่อวัยวะต่างๆ ลักษณะเช่นเดียวกันกับที่พบในกุ้งหลายชนิด นั่นคือ การได้รับเชื้อจะเกิดขึ้นที่อวัยวะภายนอกก่อน เช่น ที่เหงือกและเปลือกหุ้มลำตัว และต่อมาจึงจะค่อยมีการติดเชื้อที่อวัยวะภายในตามมาทีหลัง เช่นที่ กระเพาะอาหาร ตับ และตับอ่อน หัวใจ และเนื้อเยื่อประสาทโดยเฉพาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเนื้อเยื่อบุผิวของอวัยวะเหล่านั้น

รัชนี กลิ่นพุฒซ้อน (2002) ได้พัฒนาการตรวจสอบเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี one – step nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT – PCR) โดยใช้ primer 2 ชุด ชุดที่ 1 ประกอบด้วย forward primer (10F) 1 ตัว และ reverse primers (144R กับ 209R) อีก 2 ตัว ให้ผลบวกจะเกิดแถบขนาด 135 คู่เบส และ 200 คู่เบส ส่วนในชุดที่ 2 ประกอบด้วย forward primer (9F) 1 ตัว และ reverse primer (144R กับ 196R) อีก 2 ตัว ให้ผลบวกจะเกิดแถบขนาด 136 คู่เบส และ 188 คู่เบส จากการตรวจด้วยเทคนิค one – step nested RT-PCR สามารถตรวจสอบไวรัสหัวเหลืองที่บริสุทธิ์ได้ถึง 0.01 พิโคกรัม และไพรเมอร์มีความจำเพาะกับไวรัสหัวเหลืองเท่านั้นโดยไม่มีผลผลิตจากต้นแบบจากนิวคลีอิกของไวรัสและแบคทีเรียชนิดอื่นรวมถึงกุ้งกุลาดำเองด้วย นอกจากนี้ทำการศึกษาการกระจายตัวของไวรัสหัวเหลืองในเหงือก, ต่อมน้ำเหลือง , ขาว่ายน้ำ, ก้านชูตา, และใน haemolymph จากกุ้งที่ติดเชื้อ ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองคือเลือดกุ้ง เนื่องจาก 6 ชั่วโมงหลังจากกุ้งติดเชื้อจะเกิดผลบวก 2 แถบ (200 คู่เบส และ 135 คู่เบส) เมื่อใช้ haemolymph เป็นตัวต้นแบบในการตรวจด้วยวิธี one – step nested RT – PCR ในขณะที่ตัวอย่างชนิดอื่นเกิดผลบวกเพียง 1 แถบ (135คู่

เบส) นอกจากนี้เลือดกุ้งยังเป็นตัวอย่างที่เก็บทำการทดลองได้สะดวกและไม่ทำให้กุ้งตายระหว่างการทดลอง จากนั้นทำการทดสอบต่อว่า ปูทั้ง 4 ชนิดคือ ปูม้า,ปูทะเล , ปูแสม และปูก้ามดาบเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองและสามารถทำการถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งได้หรือไม่ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าปูเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองและสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่กุ้งกุลาดำปกติได้โดยผ่านทางน้ำ

ยัยนับ แวะและ (2002) ทำการทดลองตรวจหาเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ได้แก่ กุ้งฝอยน้ำเค็ม *Palaemon serrifer* ซึ่งมาจากจังหวัดชลบุรี กุ้งกะเปาะ *Palaemon styliferus* กุ้งกะต่อม *Macrobrachium sintangense* กุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* และกุ้งในวงศ์ Penaeidae ได้แก่ กุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* กุ้งหัวมัน หรือ กุ้งหัวเหลือง *Metapenaeus brevicornis* และกุ้งวงศ์ Atyidae ได้แก่กุ้งกะปิ *Caridina sp.* บริเวณจังหวัดสมุทรปราการ จากการเหนี่ยวนำการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และการกินเนื้อกุ้งกุลาที่ติดเชื้อไวรัสอย่างรุนแรงในเวลา 3 วัน และจับจากธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry โดยใช้แอนติบอดีต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของไวรัสหัวเหลือง คือ V3-2B , Y18-2D และ Y19 ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของกุ้งที่จับจากธรรมชาติทั้ง 3 วงศ์ พบกุ้งในวงศ์ Panaeidae คือ *Metapenaeus affinis* 4 จาก 10 ตัวเท่านั้นที่ติดเชื้อจากการกิน ส่วนใหญ่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงเมื่อได้รับการฉีด ส่วนกุ้งในวงศ์ Palaemonidae ทุกชนิดไม่มีการติดเชื้อด้วยการกิน แต่ในการฉีดพบ *Macrobrachium rosenbergii* 1 ในทั้งหมด 21 ตัว และ *Macrobrachium lanchesteri* 4 ในทั้งหมด 22 ตัว ซึ่งส่วนน้อยที่แสดงการติดเชื้อ แต่ *Macrobrachium sintangense* 8 ในทั้งหมด 12 ตัว และ *Palaemon styliferus* 9 ในทั้งหมด 10 ตัว ส่วนใหญ่มีการติดเชื้อแต่ไม่รุนแรง ขณะที่ *Palaemon serrifer* และ *Caridina sp.* ไม่พบการติดเชื้อเมื่อได้รับเชื้อโดยการกิน และฉีดไม่ได้เนื่องจากตัวขนาดเล็ก จากการทดลองพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 135 กิโลดาลตัน แสดงการติดสีปริมาณน้อยแตกต่างชัดเจนจากแอนติบอดีต่อโปรตีนขนาด 67 และ 22 กิโลดาลตัน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับความสามารถในการทนทานต่อการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกลุ่มนี้บางชนิด