บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น Centrikon T-42K ของบริษัท Kontron Instrument., Germany

2. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA

3. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA

4. เครื่องผสมสาร (Vortex mixter) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., Switzerland

5. หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany

7. เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany.

8. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA

9. เครื่องเขย่า (Incubator shaker)

10. ไสลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

2. อาหาร Mueller Hinton Broth ของบริษัท Difco Laboratories, USA

3. อาหารแข็งโครโมเคาท์โคลิฟอร์ม (Chromocult R Coliforms Agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ (Thiosulfate citrate bile salt agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ชุดตรวจสารปฏิชีวนะในอาหาร CM-Test ของคณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. บีตากลูแคน (β-glucan)เตรียมจาก Baker's yeast ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

7. อาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ของบริษัทโภคภัณฑ์อะควอเท็ค จำกัด

3.3 สารเคมีสำหรับ Immunohistochemistry

1. เอทิลแอลกอฮอลล์ (Ethyl alcohol) 70%, 80%, 90%, 95% BDH
2. N-butyl alcohol Univar
3. ไซลีน (Xylene) Carlo Erba
4. Formaldehyde Carlo Erba
5. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) 0.15 M pH 7.2 (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
6. สารละลาย P1+ (calf bovine serum:PBS dilution 1:10) (วิธีเตรียมดูภาคผนวกข)
7. ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ Sigma
(Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)
8. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2) 30 % Sigma
9. อิโอซิน (Eosin Y) 0.02% ใน เอทิลแอลกอฮออล์ 95 %Harleco(วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
10. ฮีมาทอกไซลีน (Hematoxylin) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข) Harleco
11. พาราพลาส พลัส พาราฟิน (Paraplast plus paraffin) Sherwood
12. สารละลายเคลือบสไลด์ (Gelatin coat slide solution) Difco (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
13. Davidson's fixative (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide , NaOH) Riedel-de Haen
15. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl) Merck
16. Permount Ficther Scientific
17. โมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ต่อ *Vibrio harveyi* สายพันธุ์ 639 (Phianphak, 2005) (วิธีเตรียมดูภาคผนวก ข)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 เตรียมสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากเซลล์โพรไบโอติก แบคทีเรีย*Bacillus* สายพันธุ์ S11(F-BS11)และโพรไบโอติก แบคทีเรีย*Bacillus* สายพันธุ์ S11 (BS11)

(ดัดแปลงจากวิธี จันทนา นิธิเมธาโชค, 2539)

3.4.1.1 การเตรียมเซลล์โพรไบโอติก แบคทีเรีย (BS11) โดยเลี้ยง BS11ในอาหารสูตรสำหรับเลี้ยง BS11 บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นเติมฟอร์มาลิน 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทิ้งไว้ 18 ชั่วโมงนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 รอบ นำเซลล์ที่ได้เก็บในสภาพเยือกแข็ง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.1.2 การเตรียมโพรไบโอติกแบคทีเรีย (BS11) โดยเลี้ยง BS11ในอาหารสูตรสำหรับเลี้ยง BS11 บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้เก็บในสภาพเยือกแข็ง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.2 เตรียมอาหารกุ้งกุลาดำผสมเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรียซึ่งถูกทำให้เสียสภาพด้วยฟอร์มาลิน (F-BS11) โพรไบโอติกแบคทีเรีย (BS11) และ อาหารกุ้งกุลาดำผสมบีตากลูแคน (BG)

3.4.2.1 อาหารสำหรับการทดสอบเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำและเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (BS11) โดยแปรตามอัตราส่วนต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งปกติ (C)

กลุ่มที่ 2 อาหารกุ้ง: เซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11-1) อัตราส่วน 2: 1(น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก)

กลุ่มที่ 3 อาหารกุ้ง: เซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11-2) อัตราส่วน 3: 1(น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก)

กลุ่มที่ 4 อาหารกุ้ง: เซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11-3) อัตราส่วน 6: 1(น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก)

คลุกอาหารกุ้งและเซลล์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกซึ่งถูกทำให้เสียสภาพด้วยฟอร์มาลีน ให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำให้อาหารแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1- 2 ชั่วโมง กระจายไม่ให้อาหารติดกันเป็นก้อน เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดในตู้เย็น

3.4.2.2 อาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย (BS11)

คลุกอาหารกุ้งและโพรไบโอติกแบคทีเรีย (BS11) อัตราส่วน 3: 1 ให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำให้อาหารแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 1- 2 ชั่วโมง กระจายไม่ให้อาหารติดกันเป็นก้อน เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดในตู้เย็น

3.4.2.2 อาหารกุ้งกุลาดำผสมบีตากลูแคน (BG)

ผสมบีตากลูแคน (BG) ในอาหารกุ้ง 2 กรัม/กิโลกรัม (ปริมาณที่ผู้ผลิตแนะนำให้ใช้) ให้เข้ากัน เก็บใส่ภาชนะที่สะอาดในตู้เย็น

3.4.3 การทดลองครั้งที่ 1 และ 2 เปรียบเทียบสูตรอาหารผสมเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11) กับบีตากลูแคน (BG)

โดยแต่ละครั้งแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่มทดลอง

กลุ่มทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งปกติ (C)

กลุ่มทดลองที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารผสมบีตากลูแคน (BG) 2 กรัม/กิโลกรัมในอาหารกุ้ง

กลุ่มทดลองที่ 3 อาหารกุ้ง: เซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11-1) อัตราส่วน 2: 1(น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก)

กลุ่มทดลองที่ 4 อาหารกุ้ง: เซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11-2) อัตราส่วน 3: 1(น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก)

กลุ่มทดลองที่ 5 อาหารกุ้ง: เซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย(F-BS11-3) อัตราส่วน 6: 1(น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก)

3.4.3.1 เลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสม และเปรียบเทียบสูตรอาหารผสมเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11) สำหรับกุ้งกุลาดำ กับบีตากลูแคน (BG)

3.4.3.1.1 ใช้กุ้งกุลาดำระยะ Postlarva 15 จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงขนาด 0.8 ลูกบาศก์เมตร บรรจุน้ำซึ่งมีความเค็ม 20 ส่วนในพันส่วน(ppt) ทำการทดลอง 2 ครั้ง เนื่องจากปริมาณบ่อทดลองไม่เพียงพอต่อการทดลอง โดยการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ปล่อยกุ้งจำนวน 80 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศตลอดเวลา กรองน้ำโดยใช้ระบบหมุนเวียนแบบปิด ให้อาหาร 3 มื้อต่อวัน เลี้ยงปรับสภาพให้กุ้งคุ้นเคยกับบ่อด้วยอาหารปกติ และเริ่มทำการทดลองเมื่อกุ้งกุลาดำระยะ Postlarva 25 เลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน

3.4.3.1.2 ควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งทุก 7 วัน โดยควบคุม

- แอมโมเนีย (NH_4^+) ใช้ Ammonium test kitบริษัท D52518 Heinsberg, Germany
- ไนไตรท์ (NO_2^-) ใช้ Nitrite test kit บริษัท D 52518 Heinsberg, Germany
- ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) ใช้ Phosphate test kit บริษัท D 52518 Heinsberg, Germany
- อุณหภูมิ ใช้ thermometer
- พีเอช (pH) ใช้ pH meter
- ความเค็ม ใช้ salinometer

3.4.3.1.3 ระหว่างทำการเพาะกุ้งเลี้ยงสังเกตอัตราการเจริญของกุ้งโดยวัดความยาว และชั่งน้ำหนักของกุ้ง ทุกๆ 20 วัน

3.4.3.1.4 ระหว่างทำการเพาะเลี้ยงกุ้งตรวจ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, *E. coli* และ *Vibrio* spp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งทุกๆ 14 วัน

3.4.3.1.5 นับอัตราการรอดชีวิตของกุ้งกุลาดำทุกกลุ่มการทดลองหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน

3.4.3.1.6 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน

3.4.3.1.7 ทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิดโรค (challenge test) โดยการแช่ (immersion) *Vibrio harveyi* หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 100 วัน พร้อมทั้งตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

3.4.4 การทดลองครั้งที่ 3 เปรียบเทียบสูตรอาหารผสมเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11) สูตรอาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย (BS11) และ สูตรอาหารผสมบีตากลูแคน (BG)

โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง กลุ่มการทดลองละ 3 บ่อ

กลุ่มทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้อาหารกุ้งปกติ (C)

กลุ่มทดลองที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารผสมบีตากลูแคน (BG) 2 กรัม/กิโลกรัม

กลุ่มทดลองที่ 3 อาหารกุ้ง: เซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11-2) อัตราส่วน 3: 1(น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก)

กลุ่มทดลองที่ 4 อาหารกุ้ง: โพรไบโอติกแบคทีเรีย(BS11) อัตราส่วน 3: 1(น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักเปียก)

3.4.4.1. เลี้ยงกุ้งกุลาดำเพื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารผสมเซลล์ที่ไม่มีชีวิตของโพรไบโอติกแบคทีเรีย (F-BS11-2) สูตรอาหารผสมโพรไบโอติกแบคทีเรีย (BS11) และ สูตรอาหารผสมบีตากลูแคน (BG)

3.4.4.1.1 ใช้กุ้งกุลาดำระยะ Postlarva 15 จากบ่อเลี้ยงกุ้งจังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงขนาด 0.8 ลูกบาศก์เมตร บรรจุน้ำซึ่งมีความเค็ม 20 ppt ปล่อยกุ้งจำนวน 25 ตัวต่อบ่อ ให้อากาศตลอดเวลา กรองน้ำโดยใช้ระบบหมุนเวียนแบบปิด ให้อาหาร 3 มื้อต่อวัน เลี้ยงปรับสภาพให้กุ้งคุ้นเคยกับบ่อด้วยอาหารปกติ และเริ่มทำการทดลองเมื่อกุ้งกุลาดำระยะ Postlarva 25 เลี้ยงเป็นระยะเวลา 90 วัน

3.4.4.1.2 ควบคุมคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งทุก 14 วัน โดยควบคุม

- แอมโมเนีย(NH_4^+) ใช้ Ammonium test kitบริษัท D52518 Heinsberg, Germany
- ไนไตรท์(NO_2^-)ใช้ Nitrite test kit บริษัท D 52518 Heinsberg, Germany
- ฟอสเฟต(PO_4^{3-})ใช้ Phosphate test kit บริษัท D 52518 Heinsberg, Germany
- อุณหภูมิ ใช้ thermometer
- พีเอช (pH) ใช้ pH meter
- ความเค็ม ใช้ salinometer

3.4.4.1.3 ระหว่างทำการเพาะกุ้งเลี้ยงสังเกตอัตราการเจริญของกุ้งโดยวัดความยาว และชั่งน้ำหนักของกุ้ง ทุกๆ 20 วัน

3.4.4.1.4 ระหว่างทำการเพาะเลี้ยงกุ้งตรวจ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, *E. coli* และ *Vibrio* spp.ในน้ำเลี้ยงกุ้งทุกๆ 14 วัน

3.4.4.1.5 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์ และสารน้ำหลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน และ120 วัน

3.4.4.1.6 ทดสอบการชักนำให้เกิดโรคโดยการแช่ *Vibrio harveyi* หลังจากเลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 90 วัน และ120 วันพร้อมทั้งตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

3.4.5 การพิสูจน์เชื้อ *V. harveyi* ด้วยวิธี Dot blot (Sithigorngul et. al., 2002)

นำ *V. harveyi* เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทริปติกซอย ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที 15 นาทีล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง ปรับค่าโอดี (OD) 660 นาโนเมตรด้วยสารละลาย PBS ให้ได้ OD ประมาณ 1 หลังจากนั้นทำให้เสียสภาพด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แช่ในสารละลาย 5% blotto แล้วนำมาบ่มด้วย antibody จาก *V. harveyi*639 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง นำไปบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM–HRP) เจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1,500 ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย PBS 4 ครั้ง และนำไปบ่มในสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS

3.4.6 เปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์และสารน้ำ

3.4.6.1 การนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้ง (total hemocyte count) โดยเจาะเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Alsever'solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ หยด เลือด 100 ไมโครลิตร บนสไลด์นับเม็ดเลือดนับเม็ดเลือดทั้งหมดด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

3.4.6.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (antibacterial activity)ในพลาสมากุ้ง

3.4.6.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยเพาะเลี้ยง *Vibrio harveyi* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทริปติกซอย ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ให้อยู่ในช่วงลอกเฟส (log phase) ปรับค่าโอดี 660 นาโนเมตร ให้ได้ความเข้มข้น 10^4 CFU/ml โดยเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างโอดี 660 นาโนเมตรกับจำนวน *Vibrio harveyi*

นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ปั่นล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ปราศจากเชื้อ 1 ครั้ง เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่าเดิมเพื่อปรับให้ได้ 10^4 CFU/ml

3.4.6.2.2 การหาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ในพลาสมากุ้ง โดยเจาะเลือดกุ้ง 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Van Harrevald's salt 1.4 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 11,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เก็บส่วนพลาสมาไปกรองผ่านแผ่นกรอง (Millipore membrane filter) ขนาด 0.45 ไมครอน บ่มส่วนพลาสมาที่ปราศจากเชื้อ กับ *V. harveyi* 639 ที่เตรียมจากข้อ 6.2.1 อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 และ1:4 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น ปิเปต 50 ไมโครลิตร กระจายเชื้อ (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวน *Vibrio harveyi*

3.4.7 ทดสอบการชักนำให้เกิดโรคโดยการแช่ *Vibrio harveyi* 639พร้อมทั้งตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกัน

เตรียม *Vibrio harveyi* 639 ความเข้มข้นประมาณ 10^7CFU/mlในน้ำเลี้ยงกุ้ง ใช้กุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 50 วัน กลุ่มละ 20 ตัวต่อบ่อ ทดสอบความต้านทานต่อการชักนำให้เกิดโรค 5 วัน โดยติดตามผลดังนี้

3.4.7.1 การตายสะสม (cumulative mortality) ติดตามผลทุกวัน

3.4.7.2 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio harveyi* ในน้ำเลี้ยงด้วยวิธี Total plate count โดยแบคทีเรียทั้งหมดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย และ *Vibrio harveyi* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส ติดตามผลทุก 2 วัน

3.4.7.3 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดและ *Vibrio harveyi* ในลำไส้กุ้งด้วยวิธีTotal plate count โดยแบคทีเรียทั้งหมดใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย และ *Vibrio harveyi* ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไทโอซัลเฟตซิเตรทบายซอลท์ซูโครส ติดตามผลหลังการชักนำให้เกิดโรคในวันที่สอง

3.4.7.4 ตรวจสอบปัจจัยทางภูมิคุ้มกันหลังการชักนำให้เกิดโรคในวันที่สอง

3.4.8 การตรวจสอบพยาธิสภาพต่อการเกิดโรคจาก *V. harveyi* สายพันธุ์ 639 ด้วยวิธี immunohistochemistry (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Sithigorngul et al., 2000)

3.4.8.1 การเตรียมเนื้อเยื่อทาง histology

นำตัวอย่างกุ้งที่เก็บจากการทดลองหลังจาก challenge ด้วย *V. harveyi* 639 นำมาตัดหัวและแยกลำไส้ออก แช่น้ำยา Davidson's fixative ให้คงรูป ล้างออกโดยให้น้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้คือ แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, เอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเปลี่ยนมาแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95

เปอร์เซ็นต์ข้ามคืน แช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมกับนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนนำสารใหม่เข้ามาแทนที่ (clearing) นำออกไปแช่ไซลีน จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ1 ชั่วโมง

ขั้นตอนการแช่ให้แข็งตัว (impregnation) ในพาราพลาสต์ แช่ในไซลีนที่ผสมกับพาราพลาสต์หลอมเหลวปริมาณ 1:1 เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แช่ในพาราพลาสต์หลอมเหลว จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 45 นาที

ขั้นตอนการฝังพาราพลาสต์ (embedding) นำส่วนหัวของกุ้งและลำไส้แต่ละตัวจัดเรียงในก้นพิมพ์สี่เหลี่ยม จัดให้อวัยวะอยู่ตรงกลาง จากนั้นเทพาราพลาสต์หลอมเหลวลงไปให้เต็มพิมพ์ ปิดด้วยกรอบพลาสติกด้านบนที่ต้องนำไปใช้ในการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม รอจนแข็งตัวจึงแกะพิมพ์ออก

ขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อ (sectioning) ตัดเนื้อเยื่อจากอวัยวะที่ฝังในพาราพลาสต์ด้วยเครื่องไมโครโตมแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ให้แต่ละชิ้นมีความหนา 8 ไมครอน เรียงต่อกัน นำแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้มาติดบนสไลด์แก้วที่ผ่านการเคลือบด้วยสารละลายเจลาติน โดยหยดน้ำกลั่นสะอาดลงบนสไลด์ 1 แผ่น ให้พอดีกับขนาดเนื้อเยื่อ 3 ชิ้น จากนั้นนำเนื้อเยื่อลงวางบนหยดน้ำ แล้วนำไปวางบนแท่นอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50 องศาเซลเซียสเพื่อให้เนื้อเยื่อแผ่ขยายจนตึงเรียบ จากนั้นดูดน้ำออกซับให้แห้ง จะได้เนื้อเยื่อที่ติดตรึงบนสไลด์ แล้วนำไปอบในตู้อบ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.8.2 กระบวนการย้อมโดยวิธี Indirect peroxidase immunohistochemistry

ขั้นตอนการเอาพาราพลาสต์ออก (deparaffination) นำสไลด์ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น วางบนตะกร้า (slide basket) แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 ,5 และ 5 นาที ตามลำดับ

ขั้นตอนการดึงน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ (rehydration) ด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ดังนี้คือ แช่ในไซลีนที่ผสมนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที น้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที สารละสายฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 1 นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อ โดยให้ปั๊มสูญญากาศ หยดสารละลาย P_1^+ คลุมแต่ละเนื้อเยื่อด้วยไมโครปิเปต บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อป้องกันการจับกันของโปรตีนแบบไม่จำเพาะ โดยวางสไลด์ในกล่องที่ปิดฝาภายในบุด้วยกระดาษทิชชูที่เปียกชื้นเพื่อรักษาความชื้นตลอดเวลา ดูดสารละลาย P_1^+ ในแต่ละ

เนื้อเยื่อออก ยกเว้นเนื้อเยื่อที่ 2 ให้เป็นเนื้อเยื่อควบคุม หยดโมโนโคลนอลแอนติบอดี VH3-3H ในเนื้อเยื่อที่ 1 เก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ขั้นตอนการใส่แอนติบอดีที่ 2 โดยการล้างแอนติบอดีที่ 1 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำสไลด์แต่ละแผ่นมาดูดของเหลวส่วนเกินรอบนอกเนื้อเยื่อโดยใช้ปั๊มสูญญากาศ หยดแอนติบอดีที่ 2 ได้แก่ Goat antimouse IgG heavy and light chain horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) ที่เจือจางในสารละลาย P_I^+ ปริมาณ 1:1000 ในทุกเนื้อเยื่อเก็บในกล่องป้องกันความชื้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนการใส่ซับสเตรต โดยการล้างแอนติบอดีที่ 2 ออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วแช่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที นำเนื้อเยื่อแต่ละสไลด์มาทำปฏิกิริยากับ 3,3' ไดอะมิโนเบนซิดีนเตตระไฮโดรคลอไรด์ (DAB) 0.03 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ15 มิลลิกรัม และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.006 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ10 ไมโครลิตร ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ถึงขั้นนี้เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ให้ผลบวกจะสามารถเห็นเป็นสีน้ำตาล ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกไซลีนโดยนำเนื้อเยื่อ 3 แผ่นแรก หรือ 1 ชุด มาย้อมสีฮีมาทอกไซลีน แต่ในอีก 1 ชุดย้อมสีอิโอซินเพียงอย่างเดียวทำได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนนี้นำเนื้อเยื่อย้อมสีฮีมาทอกไซลีน เป็นเวลา 10 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างสีส่วนเกินออกอย่างรวดเร็ว แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น เป็นเวลา 1 นาที แช่เนื้อเยื่อในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ให้เนื้อเยื่อที่ได้เป็นสีน้ำเงินจาง แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอลล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ โดยแช่ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5นาทีเอทิลแอลกอฮอลล์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที, เอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ย้อมสีทับ (counterstain) ในเนื้อเยื่อด้วยสีอิโอซิน 0.02 เปอร์เซ็นต์ในเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ล้างสีส่วนเกินออกด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์แช่ในนอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ เป็นเวลา 5 นาที, นอร์มัลบิวทิลแอลกอฮอลล์ที่ผสมกับไซลีน ปริมาณ 1:1 เป็นเวลา 5 นาที และไซลีน จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

3.4.8.3 ขั้นตอนการทำเป็นสไลด์ถาวร

ทำโดยการผนึกสไลด์ (mount) โดยหยดเปอร์เม้าท์ (permount) ประมาณ 3 หยด บนสไลด์ นำกระจกสไลด์มาปิดโดยแตะขอบด้านหนึ่งเอียงทำมุม 45 องศาเซลเซียสแล้วค่อยๆวางลง โดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น จากนั้นจึงนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาตรวจหาตำแหน่งการติดเชื้อ *V. harveyi*

639 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตจากการติดสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในบริเวณต่างๆของเนื้อเยื่อกุ้ง

3.4.9 การตรวจสอบหาสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เบื้องต้นในเนื้อกุ้งกุลาดำโดยชุดตรวจสอบยาต้านจุลชีพตกค้าง CM-Tes t (คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

แบ่งหลอดทดสอบเป็น 6 หลอด โดย หลอดที่ 1 หลอดควบคุมผลบวก (Positive control) ใช้ antibiotic disc (คลอแรมฟีนิคอล) หลอดที่ 2 หลอดควบคุมผลลบ (Negative Control)ใช้น้ำเนื้อไร้สารต้านจุลชีพ หลอดที่ 3 น้ำคั้นจากเนื้อกุ้งกลุ่มควบคุม หลอดที่ 4 น้ำคั้นจากเนื้อกุ้งกลุ่มF-BS11 หลอดที่ 5 น้ำคั้นจากเนื้อกุ้งกลุ่มBS11 หลอดที่ 6 น้ำคั้นจากเนื้อกุ้งกลุ่มBGโดยห่อด้วยผ้าขาวบางที่ทำให้ปลอดเชื้อ ใช้ปากคีบปลอดเชื้อ คีบกระดาษกรองวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ปลอดเชื้อจุ่มในน้ำคั้นเนื้อกุ้ง และใส่ลงในหลอดชุดทดสอบ โดยให้กระดาษกรองสัมผัสกับผิวด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดชุดทดสอบ ปิดฝาหลอดด้วยเทปกาว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 ±1 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจากบ่มชุดตรวจสอบนานประมาณ 3-4 ชั่วโมง โดยนำหลอดควบคุม (Negative Control) มาดูก่อน ถ้าสีของหลอดควบคุมเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอดให้อ่านผลการทดสอบทั้งหมด การแปลผลดังนี้คือหลอดทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าไม่มีสารต้านจุลชีพ หลอดทดสอบเป็นสีม่วง แสดงว่ามียาต้านจุลชีพ

3.5 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design; CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย