

## ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : การชั้นสูตรโรคไอเอสเอชเอ็นในกุ้ง  
ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตร เห็นสมควรกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร เรื่อง การชั้นสูตรโรคไอเอสเอชเอ็นในกุ้ง เป็นมาตรฐานทั่วไป ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑ เพื่อส่งเสริมสินค้าเกษตรให้ได้คุณภาพ มาตรฐาน และปลอดภัย

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา ๕ มาตรา ๑๕ และมาตรา ๑๖ แห่งพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑ ประกอบมติคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตร ในการประชุม ครั้งที่ ๓/๒๕๕๙ เมื่อวันที่ ๕ กันยายน ๒๕๕๙ รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : การชั้นสูตรโรคไอเอสเอชเอ็นในกุ้ง มาตรฐานเลขที่ มกษ. 10455 - 2559 ไว้เป็นมาตรฐานทั่วไป ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ทั้งนี้ ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ ๒๐ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๕๙

พลเอก ฉัตรชัย สาริกัลยะ

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

# มาตรฐานสินค้าเกษตร

## การชันสูตรโรคไอเอสเอชเอ็นในกุ้ง

### 1. ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรนี้ กำหนดการชันสูตรโรคไอเอสเอชเอ็นในกุ้งทางห้องปฏิบัติการ ครอบคลุมตั้งแต่ ตัวอย่างเพื่อการชันสูตร การตรวจรอยโรคภายนอก (gross lesion) วิจุลพยาธิวิทยา (histopathological method) และวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology method)

### 2. นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 โรคไอเอสเอชเอ็น (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis disease; IHHN disease) หมายถึง โรคในกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสไอเอสเอชเอ็น (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus; IHNV) กุ้งที่ไวต่อการติดเชื้อ IHNV เช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งฟ้า (*Penaeus stylirostris*) ตรวจพบเชื้อได้ในกุ้งทุกวัยตั้งแต่ไข่ กุ้งวัยอ่อน กุ้งหลังวัยอ่อน กุ้งวัยรุ่น และกุ้งตัวเต็มวัย

2.2 กุ้ง (shrimp and prawns) หมายถึง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ได้แก่ กุ้งในวงศ์ Penaeidae และ Palaemonidae

2.3 การชันสูตรโรค (diagnosis) หมายถึง การตรวจสอบเพื่อการวินิจฉัยโรค

2.4 กุ้งวัยอ่อน (larva) หมายถึง ลูกกุ้งที่เพิ่งออกจากไข่และมีการเปลี่ยนรูปร่าง 3 ระยะ คือ นอเพลียส (nauplius) โซเอีย (zoea) และไมซิส (mysis) รวมใช้เวลาประมาณ 8 วัน ถึง 11 วัน

2.5 กุ้งหลังวัยอ่อน (postlarva; PL) หมายถึง กุ้งที่เจริญหลังจากระยะไมซิสจนถึงระยะวัยรุ่น มีรูปร่างเหมือนกุ้งตัวเต็มวัย นิยมเขียนย่อว่า PL แล้วตามด้วยจำนวนวันที่กุ้งเข้าสู่ระยะหลังวัยอ่อน

2.6 กุ้งวัยรุ่น (juvenile) หมายถึง กุ้งหลังระยะหลังวัยอ่อนที่มีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัยแต่อวัยวะสืบพันธุ์ยังพัฒนาไม่เต็มที่

2.7 กุ้งตัวเต็มวัย (adult) หมายถึง กุ้งโตเต็มที่ อวัยวะสืบพันธุ์พัฒนาเต็มที่แล้วและสืบพันธุ์ได้

2.8 เลือด (haemolymph) หมายถึง องค์ประกอบของน้ำเลือดและเม็ดเลือดที่อยู่ในระบบไหลเวียนเลือดของกิ้ง

2.9 วิธีทดสอบโรคเบื้องต้น (presumptive diagnosis) หมายถึง วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นแนวทางในการชันสูตรโรค

2.10 วิธีทดสอบยืนยันโรค (confirmatory diagnosis) หมายถึง วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการยืนยันผลการชันสูตรโรคและเป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีความจำเพาะและความไวสูงกว่าวิธีทดสอบโรคเบื้องต้น

2.11 ความจำเพาะ (specificity) ของวิธีการชันสูตร หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบในกลุ่มตัวอย่างจากตัวอย่างที่ไม่ติดเชื้อ

2.12 ความไว (sensitivity) ของวิธีการชันสูตร หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในกลุ่มตัวอย่างจากตัวอย่างที่ติดเชื้อ

2.13 ตัวอย่างควบคุมผลบวก (positive control sample) หมายถึง ตัวอย่างที่มีเชื้อหรือส่วนประกอบของเชื้อ IHNV ซึ่งเมื่อนำไปผ่านกระบวนการชันสูตรตามขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแล้ว ให้ผลบวก

2.14 ตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control sample) หมายถึง ตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อหรือส่วนประกอบของเชื้อ IHNV ซึ่งเมื่อนำไปผ่านกระบวนการชันสูตรตามขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแล้ว ให้ผลลบ

### 3. ข้อกำหนด

การชันสูตรโรค IHHN ในกุ้ง ให้เป็นไปตามตารางที่ 1 สำหรับรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติของแต่ละวิธี อาจแตกต่างกันในห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง โดยต้องเป็นวิธีชันสูตรที่ประกาศโดย OIE หรือเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการที่เป็นที่ยอมรับระดับระหว่างประเทศ หรือมีการประเมินความใช้ได้ (validation) แล้วว่ามีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ที่เหมาะสม

ตารางที่ 1 รายการข้อกำหนดการชันสูตรโรค IHHN ในกุ้ง

รายการ	ข้อกำหนด
1. ตัวอย่างเพื่อการชันสูตร	<p>1.1 ตัวอย่างเพื่อตรวจรอยโรคภายนอก หรือตรวจด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา</p> <p>1.1.1 ต้องเป็นตัวอย่างกุ้งมีชีวิตหรือกุ้งป่วยใกล้ตาย และรักษาสภาพตัวอย่างไว้ในสารละลายคงสภาพเดวิดสัน (Davidson's fixative)</p> <p>1.2 ตัวอย่างเพื่อตรวจด้วยวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุล</p> <p>1.2.1 ต้องเป็นตัวอย่างกุ้งมีชีวิต หรือเป็นอวัยวะเป้าหมาย ได้แก่ ขาวายน้ำ เหงือก ต่อมแอนเทนนอล (antennal gland) ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) ก้านตา โดยไม่มีลูกตา</p> <p>1.2.1.1 เก็บตัวอย่างไว้ในเอทานอลความเข้มข้น 90% ถึง 95% อุณหภูมิไม่เกิน 4 °C ส่งห้องปฏิบัติการ และตรวจวิเคราะห์ภายใน 1 สัปดาห์หลังการเก็บตัวอย่าง หรือ</p> <p>1.2.1.2 แช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง ส่งห้องปฏิบัติการภายใน 24 h และตรวจวิเคราะห์ทันที หรือเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งและวิเคราะห์ภายใน 1 สัปดาห์หลังการเก็บตัวอย่าง</p> <p>1.2.2 ตัวอย่างเลือดกุ้ง เจาะจากแองเงอเลือดใต้ท้อง บริเวณขาว่ายน้ำคู่แรก หรือจากแองเงอเลือดบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ถึงขาเดินคู่สุดท้าย โดยใช้เข็มและกระบอกฉีดยาปลอดเชื้อ ที่มีสารละลายป้องกันการแข็งตัวของเลือด เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 4 °C และดำเนินการตรวจตัวอย่างภายในระยะเวลา 24 h</p> <p>1.3 ตรวจสอบและบันทึกข้อมูลของตัวอย่างเพื่อการชันสูตร</p>
2. วิธีทดสอบโรคเบื้องต้น (1) วิธีการตรวจรอยโรคภายนอก	<p>2.1 ตรวจสภาพภายนอกของตัวอย่างกุ้งเพื่อตรวจโรค อย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างร่วมกัน ดังต่อไปนี้ แคระแกร็น (Runt Deformity Syndrome; RDS) มีเปลือกผิดปกติทำให้ตัวคดงอหรือสั้น กรีโค้งงอหรือบิด (bent rostrum) หนวดกุ้งหักงอ (brittle or wrinkled antenna) หัวกุ้งโป่งพอง (bubble head) หรือมีการผิดปกติที่ปล้องท้องที่ 6</p>

รายการ	ข้อกำหนด
<p>(2) วิธีจุลพยาธิวิทยา</p>	<p>2.2 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการรักษาให้คงสภาพและการเตรียมเนื้อเยื่อมาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin; H&amp;E)</p> <p>2.3 ตรวจตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา คือ อนุภาคฝังในรูปร่างกลมติดสีแดงอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ (Cowdry A type eosinophilic intranuclear inclusions)</p>
<p>3. วิธีทดสอบยืนยันโรคโดยวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุล : วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)</p>	<p>3.1 ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ตามขั้นตอนดังนี้</p> <p>3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ</p> <p>3.1.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายแบบทวีคูณโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะจนมีจำนวนมากพอที่จะตรวจพบได้</p> <p>3.1.3 แยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)</p> <p>3.1.4 ตรวจหาลำดับสารพันธุกรรมเพื่อยืนยันความจำเพาะของแถบดีเอ็นเอ</p> <p>3.2 ในการตรวจวินิจฉัยโรคทุกครั้งต้องมีตัวอย่างควบคุมผลบวกและตัวอย่างควบคุมผลลบ</p>