การจำแนกไวรัสที่เป็นสาเหตุการตายของลูกกุ้งก้ามกราม *(Macrobrachium rosenbergii)* ในประเทศไทย

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VIRAL PATHOGENS IN DISEASED GIANT FRESHWATER PRAWN *(Macrobrachium rosenbergii)* LARVAE IN THAILAND

ชัยวุฒิ สุดทองคง

Chaiwud Sudthongkong

บทคัดย่อ

การศึกษาสาเหตุการตายของกุ้งก้ามกราม *(Macrobrachium rosenbergii)* วัยอ่อนซึ่งเกิดขึ้นในหลายพื้นที่ของประเทศตั้งแต่ปี 2547 และรุนแรงขึ้นในปี 2548 จนทำให้โรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามหลายแห่งต้องหยุดกิจการลงชั่วคราว เนื่องจากลูกกุ้งมีอัตราการตายสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมักพบในช่วงก่อนระยะลูกกุ้งคว่ำตัว ผลการรวบรวมตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามที่แสดงอาการป่วยและตายมาศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR และ RT – PCR พบว่าตัวอย่างทั้งหมดไม่มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) ไวรัสโรคแคระแกรน (IHHNV) ไวรัสโรคหัวเหลือง (YHV) และทอราซินโดมไวรัส (TSV) แต่อย่างใด ในขณะที่การทดสอบกับเชื้อ Extra small virus (XSV) และ *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคหางขาว (white tail disease) ในลูกกุ้งก้ามกรามให้ผลเป็นบวก โดยพบว่ามีโครงสร้างทางพันธุกรรมคล้ายกับ (XSV) และ MrNV สายพันธุ์ที่พบในประเทศจีน ไต้หวัน และอินเดียมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อ โดยใช้ชุด primers ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ XSV และ *Mr*NV กับตัวอย่างลูกกุ้งที่ตายก่อนระยะคว่ำและพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่รวบรวมจากจังหวัดสุพรรณบุรี ปทุมธานีและราชบุรี ปรากฏว่าตรวจพบการติดเชื้อ XSV และ *Mr*NV ในทุกตัวอย่างที่ศึกษา การทดสอบการยอมรับเชื้อและความไวต่อโรคของกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนต่อเชื้อ พบว่ามีการติดเชื้อ XSV และ MrNV ในทุกกลุ่มการทดลองยกเว้นกลุ่มควบคุม

การศึกษาครั้งนี้สามารถวินิจฉัยถึงสาเหตุการตายของกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน และสามารถนำข้อมูลไปเผยแพร่สู่เกษตรกร หน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องให้ทราบ และแนะนำวิธีการเฝ้าระวังป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อ รวมทั้งให้บริการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค PCR ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 ซึ่งช่วยลดความรุนแรงการระบาดของโรคที่จะเกิดขึ้นในอนาคต

ABSTRACT

Isolation and identification of viral pathogens in diseased giant freshwater prawn *(Macrobrachium rosenbergii)* in Thailand during 2004 to 2005 were performed. Juvenile prawn was the most susceptible stage and mortality was found up to 80% of the stocks in several areas of the country. PCR technique analysis was used to detect pathogens including white spot syndrome virus

(WSSV), infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHNV), yellow head virus (YHV), taura syndrome virus (TSV), extra small virus (XSV) and *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV). The PCR products showed negative results for WSSV, IHHNV, YHV and TSV, but showed positive results for XSV and *Mr*NV The sequence analysis of XSV and *Mr*NV showed more than 95% homology to XSV and MrNV isolated from the People's Republic of China, Taiwan and India. Giant freshwater prawn from Supanburi, Patumthani and Ratchaburi provinces were also found infected by these pathogens after using PCR technique detection. Experimental transmissions of XSV and *Mr*NV were carried out by immersion healthy post-larvae prawn in viral homogenized suspension. The cumulative mortality reach to 100% within 5 day after treated.

The results of this study were detection and identification of the viral disease which caused high mortality in giant freshwater prawn. The detail on clinical sign and cause of disease are informed to the farmers and the fishery biologists. Samutsakhon coastal fisheries research and development center was used PCR analysis for detect XSV and *Mr*NV in giant freshwater prawn from July 2005. The method of prevention and control the spreads of the disease were also distributed.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร ตู้ ปณ.50 ต. โคกขาม อ. เมือง จ.สมุทรสาคร 74000
Samutsakhon Coastal Fisheries Research and Development Center,P.O.Box 50,Samutsakhon 74000,Thailand

คำนำ

ในช่วงปลายปี พ.ศ. 2547 ถึงต้นปี พ.ศ. 2548 โรงเพาะฟักและอนุบาลกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rocenbergii*) ในหลายพื้นที่ของประเทศประสบปัญหาการตายของลูกกุ้งระยะวัยอ่อนอย่างรวดเร็วโดยไม่ทราบสาเหตุ ทำความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามเป็นอย่างมาก จนทำให้โรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามต้องหยุดกิจการชั่วคราว โดยเฉพาะในเขตพื้นที่จังหวัดราชบุรีและ จังหวัดสุพรรณบุรี จากปัญหาที่เกิดขึ้น จึงมีเกษตรกรนำกุ้งเข้ามาตรวจที่ห้องปฏิบัติการคลินิกสัตว์น้ำ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร เกษตรกรให้ข้อมูลว่าลูกกุ้งที่ตายส่วนใหญ่อยู่ในระยะก่อนคว่ำตัวโดยมีอัตราการตายสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบการตายของกุ้งก้ามกรามระยะโตเต็มวัยโดยไม่ทราบสาเหตุเช่นกัน โดยพบว่ามีอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติ การตรวจสอบในเบื้องต้นยังไม่พบสาเหตุที่ทำให้เกิดการตาย

จากปัญหาดังกล่าวนี้ผู้วิจัยได้ตั้งข้อสันนิฐานว่าสาเหตุการตายอาจจะมาจากการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม โดยเฉพาะในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนโดยตัดประเด็นการตายที่เกิดจากปัญหาคุณภาพน้ำ และสารเคมีออกไป เนื่องจากพบการตายของกุ้งก้ามกรามในหลายพื้นที่ของหลายจังหวัดในช่วงระยะเวลาใกล้เคียงกัน ดังนั้นสาเหตุที่มีความเป็นไปได้คือ เป็นการเกิดโรคระบาดที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียและไวรัส หลังจากได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งที่แสดงอาการป่วยและตาย ปรากฏว่าไม่พบเชื้อที่ก่อโรครุนแรงและทำให้มีการระบาดในระยะเวลาอันสั้น จึงมุ่งสนใจที่การแยกเชื้อไวรัส โดยได้ทดสอบกับไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus) ไวรัสโรคแคระแกรน (Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis) ไวรัสโรคหัวเหลือง

(Yellow head virus) ทอราซินโดรมไวรัส (Taura syndrome virus) และไวรัสที่ได้จากการสืบค้นจากเอกสารและอินเทอร์เนตซึ่งอ้างว่าเป็นสาเหตุของการตายของกุ้งก้ามกรามในหลายประเทศ คือ Extra small virus (XSV) และ *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) (Widada และคณะ 2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามและพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่แสดงอาการป่วยและตาย ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2547 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 นำมาทดสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคPCR (Polymerase chain reaction) และ RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) โดยใช้ชุด primer ตรวจหาไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus) ไวรัสโรคแคระแกรน (Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis) ไวรัสโรคหัวเหลือง (Yellow head virus) ทอราซินโดรมไวรัส (Taura syndrome virus) และ ไวรัสโรคหางขาว (White tail disease) (*Mr*NV, XSV)

2. การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR

2.1 สกัด DNA จากตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามที่ตายก่อนระยะคว่ำตัว รวมถึงพ่อแม่พันธุ์ของลูกกุ้งที่ใช้ในการเพาะพันธุ์ โดยใช้ DNAzol ® Reagent (Gibco BRL)

2.2 สกัด RNA จากตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามที่ตายก่อนระยะคว่ำตัว รวมถึงพ่อแม่พันธุ์ของลูกกุ้งที่ใช้ในการเพาะพันธุ์ โดยใช้ โดยใช้ Tri-zol ® Reagent (Gibco BRL) ตามวิธีของ Arno Sewall และ Sharon McRae, Technical Services Life Technologies, Inc. Rockville Maryland

2.3 นำ DNA ที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกรามมาตรวจหาไวรัส White spot syndrome virus (WSSV) Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHNV) โดยใช้ชุด specific primer ที่ตีพิมพ์ใน OIE 2003 ร่วมกับเทคนิค PCR และเอนไซม์ Platinum® Taq kit (Invitrogen™)

2.4 นำ RNA ที่สกัดได้มาจากกุ้งก้ามกรามมาตรวจหา Yellow head virus (YHV) Taura syndrome virus TSV) โดยใช้ชุด specific primer ตีพิมพ์ใน OIE 2003 และ ชัยวุฒิ 2548 ในส่วนของ XSV และ *Mr*NV ใช้ชุด primer ของ Yoganandhan และคณะ 2005 ตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ร่วมกับเอนไซม์ SuperScript™III One-step RT-PCR with Platinum® Taq kit (Invitrogen™)

2.5 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler)

2.6 นำ PCR products ที่ได้มาตรวจผลโดยใช้เทคนิค gel electrophoresis และส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง UV

3. การศึกษาลักษณะพันธุกรรมของไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค

3.1 คัดเลือก PCR products ที่มีปริมาณ DNA สูงสุด ที่ได้จากการสุ่มตรวจตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่แสดงอาการป่วย มาสกัด DNA จาก Agarose gel โดยใช้ชุดสกัด DNA Gel Extraction Kit (Millipore) และ cloning DNA ตามวิธีมาตรฐานใน Molecular cloning a laboratory manual จากนั้นส่งตัวอย่าง DNA ที่ได้จากการ cloning (plasmid DNA) ส่งไปแยกสารพันธุกรรม โดยใช้ DNA sequencer ABI PRISM model 3100

3.2เปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมที่แยกได้ คือการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อไวรัส (Alignment of nucleotide and amino acid sequences virus) รวมถึงเปอร์เซ็นต์ ความคล้ายกันกับข้อมูลใน GenBank

4. ทดสอบความรุนแรงของเชื้อไวรัสต่อกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน

4.1 การเตรียมเชื้อไวรัส

คัดเลือกกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนที่แสดงอาการป่วยจากโรคไวรัสและให้ผลการตรวจเป็นบวกด้วยเทคนิค PCR นำมาบดในโกร่งบด (Homogenizer) ที่มีสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 medium จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนเนื้อเยื่อ แล้วดูดเอาส่วนใสมากรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 µm. เพื่อใช้ในการทดลอง

4.2 การเตรียมตัวอย่างกุ้งทดลอง

คัดเลือกลูกกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนที่ผ่านการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR มาแล้ว นำกุ้งมาเลี้ยงในตู้กระจกทดลอง ที่มีน้ำระดับความเค็ม 15 ส่วนในพัน (ppt) ปริมาตร 5 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 2 กลุ่มการทดลองคือ

4.2 1. การแช่ลูกกุ้งในสารละลายที่มีเชื้อไวรัส XSV และ *Mr*NV

4.2.2 การผสมสารละลายที่มีเชื้อไวรัส XSV และ *Mr*NV กับอาหารกุ้งสำเร็จรูป

แบ่งกลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ และชุดควบคุมกลุ่มละ 3 ซ้ำ ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 มื้อ นาน 3 วันเพื่อให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพในห้องปฏิบัติการแล้วจึงนำอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ผ่านการแช่ในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 medium ที่มีเชื้อ ไวรัส กลุ่มควบคุมที่ 1 และกลุ่มควบคุมที่ 2 แช่และผสมอาหารลูกกุ้งในสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 medium ที่ไม่มีเชื้อไวรัส ตามลำดับ เติมอากาศตลอดระยะเวลาของการทดลอง

4.3 เก็บตัวอย่างลูกกุ้งที่ตาย และบันทึกผล ทุกวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

4.3 ทดสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR

5. วิเคราะห์ข้อมูล

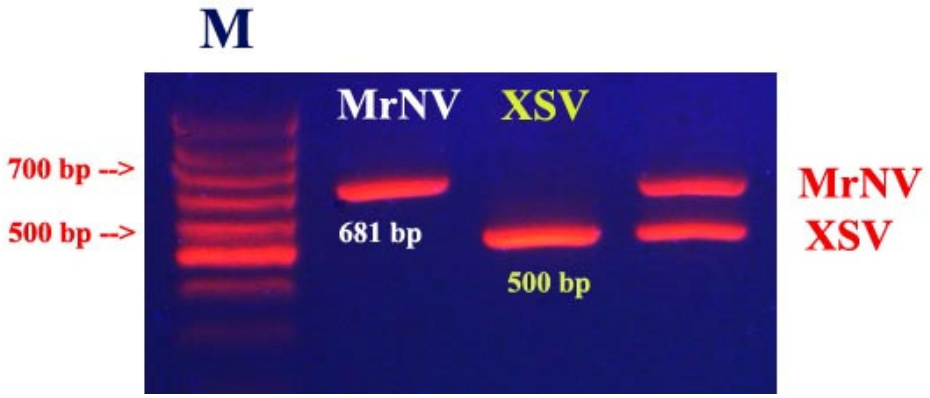
ผลการศึกษา

1. ผลการศึกษาไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR

ผลจากการทดสอบกับตัวอย่างลูกกุ้ง และพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามตามวิธีในข้อ 1 พบว่า

Primer set WSSV, IHHNV, YHV และ TSV ให้ผลเป็นลบ

Primer set XSV และ MrNV ให้ผลป็นบวก (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 MrNV and XSV PCR products from post larvae and brood stock of Giant freshwater prawn

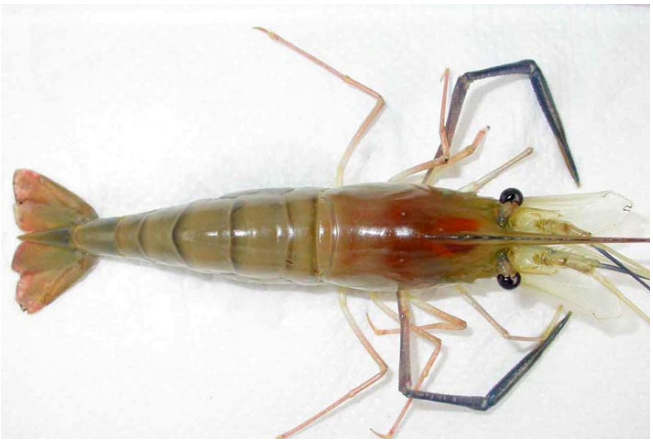
2. ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของ XSV และ *Mr*NV

ผลการตรวจหาโครงสร้างทางพันธุกรรม เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อ XSV ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่ตายก่อนระยะคว่ำคล้ายกับโครงสร้างทางพันธุกรรมในส่วนของ coat protein (capsid protein gene) ที่พบใน XSV ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม ในประเทศอินเดีย (GenBank acc AY247793 (Sri Widada และคณะ 2004) และ AM114037 (Tripathy และคณะ 2006) 98 เปอร์เซ็นต์ ไต้หวัน DQ521573 (Wang และ Chang 2006) 99 เปอร์เซ็นต์ และประเทศจีน DQ174318 (Zhang และคณะ 2004) และ AY655724 (Zhang และShi 2004) 99 เปอร์เซ็นต์ โครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อ *Mr*NV ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่ตายก่อนระยะคว่ำคล้ายกับโครงสร้างทางพันธุกรรมในส่วนของ coat protein (capsid protein gene) ที่พบใน *Mr*NV ที่แยกได้จากกุ้งก้ามกราม ในเขต French West Indies (GenBank acc AY222840) 98 เปอร์เซ็นต์ ประเทศอินเดีย (GenBank acc AM114036) 99 เปอร์เซ็นต์ ไต้หวัน (GenBank acc DQ521575) 99 เปอร์เซ็นต์ และจีน (GenBank acc AY231437) 99 เปอร์เซ็นต์

3. การยอมรับเชื้อ XSV และ *Mr*NV

ผลการทดสอบการยอมรับเชื้อ XSV และ *Mr*NV ของกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน พบว่ากุ้งในทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับเชื้อทั้งสองชนิด โดยการผสมเชื้อไวรัสกับอาหารสำเร็จรูปและการแช่ในสารละลายที่มีไวรัส ตายหมด 100% ภายในระยะเวลา 5 วันของการทดลอง ในขณะที่กุ้งในกลุ่มควบคุมพบการตาย 3.33% จากการแช่ และ 6.66% จากการผสมอาหาร

ผลการทดสอบลูกกุ้งที่ตายด้วยเทคนิค PCR พบว่าลูกกุ้งติดเชื้อ XSV, *Mr*NV ในทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบเชื้อ



ภาพที่ 2 Giant freshwater prawn infected with XSV and *Mr*NV

สรุปและวิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่มีการตายในอัตราสูงในช่วงก่อนและหลังระยะคว่ำตัว โดยการตรวจหาแบคทีเรีย, ปรสิตและไวรัส 4 ชนิด ที่เคยก่อโรคในกุ้งทะเล ไม่พบการติดเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ไม่พบไวรัส WSSV,YHV, TSV, IHHNV จากการทดสอบด้วยเทคนิค PCR แต่กลับแสดงผลบวกด้วยชุด primer sets ของ XSV และ *Mr*NV (Yoganandhan และคณะ 2003) จึงมีความเป็นไปได้ว่าลูกกุ้งก้ามกรามที่ตายมีสาเหตุจากการติดเชื้อ XSV และ *Mr*NV ลักษณะของกุ้งที่แสดงอาการป่วยพบว่ากล้ามเนื้อส่วนหางมีลักษณะขาวขุ่น โดยจะเห็นลักษณะสีซีดเกิดขึ้นในบริเวณปลายหางและลามมาถึงกล้ามเนื้อส่วนลำตัว (Sahul Hameed และคณะ 2004) ซึ่งใกล้เคียงกับลักษณะและอาการของตัวอย่างกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน จากจังหวัดสุพรรณบุรีที่พบว่าตัวอย่างกุ้งบางส่วนมีลักษณะขุ่นขาวของกล้ามเนื้อส่วนลำตัวและหาง แต่ในขณะเดียวกันกุ้งระยะวัยอ่อนบางตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ *Mr*NV และ XSV กลับไม่พบลักษณะขุ่นขาวในกล้ามเนื้อ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรัสสามารถทำให้กุ้งตายได้รวดเร็วโดยกุ้งยังไม่แสดงลักษณะอาการของโรคโดยเฉพาะในช่วงก่อนหรือหลังการลอกคราบของกุ้งใหญ่ และช่วงหลังและก่อนระยะการคว่ำตัวของลูกกุ้ง นอกจากนี้ยังมีความเป็นได้ว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อระหว่างตัวอย่างที่ติดเชื้อกับตัวอย่างกุ้งที่ไม่ติดเชื้อ อย่างไรก็ตามในเวลาต่อมากุ้งทั้งสอง ต่างตายในระยะเวลาใกล้เคียงกัน จากผลการตรวจหาโครงสร้างทางพันธุกรรม เปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่าโครงสร้างพันธุกรรมของเชื้อ *Mr*NV และ XSV ที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน จากจังหวัดปทุมธานี (ตัวอย่างเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว) และจังหวัดสุพรรณบุรี ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2547 และเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 คล้ายกับโครงสร้างทางพันธุกรรมในส่วนของ Capsid protein gene ที่พบใน *Mr*NV และ XSV ในประเทศอินเดีย (Tripathy และคณะ 2006) ไต้หวัน(Wang และ Chang 2006; Tung และคณะ 1999) ประเทศจีน (Shi,Z และคณะ 2003) และ French West Indies (Sri Widada และคณะ 2003) มากถึง 98- 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการแพร่ระบาดของโรคที่พบครั้งแรกบนเกาะของประเทศกัวเดลุฟ (Guadeloupe) ในปี พ.ศ. 2538 รวมถึงในประเทศมาร์ตินิค (French West Indies) (Arcier และคณะ 1999) และต่อมาพบในไต้หวัน (Tung และคณะ 1999) ประเทศจีน (Qian และคณะ 2003) และเมื่อไม่นานมานี้พบการแพร่ระบาดในประเทศอินเดีย (Sri Widada และคณะ 2004) อย่างไรก็ตามเนื่องจากเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดจัดเป็น RNA virus ซึ่งมีความสามารถในการกลายพันธุ์ได้สูงมาก โดยอ้างจากรายงานของ Domingo และ Holland (1997) ที่กล่าวว่า RNA virus เป็นพวกที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยมีลักษณะเด่นพิเศษคือ มี

อัตราการกลายพันธุ์ที่สูงมาก รวมถึงมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ดังนั้นโอกาสที่ไวรัสชนิดนี้จะเกิดการกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่องและแพร่กระจายไปทั่วประเทศดังนั้นทางราชการและเอกชนรวมถึงเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม ควรมีการศึกษาและเพิ่มมาตรการการเฝ้าระวังโรคไม่ให้ทวีความรุนแรงมากขึ้นจนกระทบต่อเพาะเลี้ยงกุ้งของไทย

การทดสอบการยอมรับเชื้อ *Mr*NV และ XSV ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน พบว่ากุ้งในทุกหน่วยการทดลองตายหมดในระยะเวลา 5 วันของการทดลอง โดยพบการตายของกุ้งในกลุ่มควบคุมเพียงเล็กน้อยตลอดระยะเวลา 7 วันของการทดลอง ซึ่งเป็นไปได้ว่าเป็นการตายเนื่องจากความเครียดในการทดลอง จากการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่ากุ้งในกลุ่มทดลองทั้งหมดติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV แสดงให้เห็นว่ากุ้งสามารถรับเชื้อได้ทั้งจากการสัมผัสและการกินอาหารที่มีเชื้อไวรัส เช่นเดียวกับการศึกษาการยอมรับเชื้อ *Mr*NV และ XSV ของ Sahul Hameed และคณะ 2004 พบว่าทำให้กุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อน (post-larvae) ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่ทำให้กุ้งระยะโตเต็มวัยแสดงอาการป่วยและตาย จากการศึกษาตัวอย่างกุ้งก้ามกรามระยะโตเต็มวัยที่แสดงอาการป่วยและตาย ที่มีลักษณะสีแดงอมส้มบริเวณรยางค์ส่วนหัวของกุ้ง พบว่าติดเชื้อ *Mr*NV และ XSV (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Zhang และคณะ 2006 ที่พบว่าสามารถทำให้กุ้งก้ามกรามระยะวัยอ่อนติดเชื้อได้โดยการแช่ในสารละลายที่มีไวรัส และพบว่าเชื้อ *Mr*NV อาจเป็นสาเหตุหลักในการทำให้กุ้งก้ามกรามแสดงอาการป่วยด้วยโรคหางขาว

ผลการศึกษาครั้งนี้จึงกล่าวได้ว่าเป็นรายงานแรกของประเทศที่สามารถยืนยันถึงสาเหตุการตายและการระบาดของเชื้อไวรัสในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน พร้อมนี้ได้แจ้งสาเหตุไปยังหน่วยงานของกรมประมง และเกษตรกร โดยการนำเสนอผลงานวิจัยบางส่วนครั้งแรกในโครงการคลินิกเกษตรเคลื่อนที่ในพระราชานุเคราะห์สมเด็จพระบรมโอรสาธิราชฯ สยามมกุฎราชกุมาร ที่อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร ในวันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ.2548 เพื่อให้ทราบถึงสาเหตุและหาวิธีป้องกัน โดยแนวทางหนึ่งคือการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส *Mr*NV และ XSV ในลูกกุ้งและพ่อแม่พันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำ Plasmid DNA ของ *Mr*NV และ XSV เพื่อใช้เป็น positive control รวมทั้งทำการตรวจสอบมาตรฐานห้องปฏิบัติการในการตรวจเชื้อ *Mr*NV และ XSV ด้วยเทคนิค RT-PCR ของกรมประมง

เอกสารอ้างอิง

ชัยวุฒิ สุดทองคง. 2548. การศึกษาโรคทอราและการจำแนกเชื้อไวรัสทอราซินโดรมของกุ้งกุลาดำในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ กรมประมง 15/2548.

Arcier J.M., Herman F., Lightner D.V., Redman R.M., Mari J., Bonami J.R. 1999. A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlavae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Dis. Aquat. Org. 38. 177-181.

Domingo, E., Holland JJ. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. Annu Rev Microbiol. 1997;51:151-78.

Lightner, D.V. and R.M. Redman.1994. New and emerging infectious and non-infectious diseases in commercial shrimp culture. International Symposium on Aquatic Animal Health (Seattle, 4-8 September), p. V-3.

Lightner, D.V. 1996. A Handbook of shrimp Pathology and Diagnostics Procedures for Disease of Culture Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

OIE, Office International de Epizooties. 2003. Diagnostic Manual for Aquatic Animals Diseases. Office International de Epizooties, Paris.

Qian D., Shi Z., Zhang S., Cao Z., Liu W., Li L., Xie Y., Cambournca I., Bonami J.R. 2003. Extra small virus-like particle (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Fish Dis. 26, 521-527.

Sahul Hameed As., Yoganand K., Sri Widada J., Bonami JR. 2004. Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*Mr*NV) and its associated extra small virus (XSV). Dis. Aquat. Org. 62(3):191-6.

Shi,Z., Xie,Y., Tang,X., Qian,D., Sri Widada,J. and Bonami,J.R. 2005. Sequence comparison of two Macribrachium rosenbergii nodavirus isolates.) Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, 44 Xiao Hong Shan, Wuhan, Hubei 430071, China.

Tripathy,S., Sahoo,P.K., Kumari,J., Mishra,B.K., Sarangi,N. and Ayyappan,S. 2006. Multiplex RT-PCR detection and sequence comparison of viruses MrNV and XSV associated with white tail disease in *Macrobrachium rosenbergii.* Aquaculture 258 (1-4), 134-139.

Tung C.W., Wang C.S., Chen S.N. 1999. Histological and electron microscopy study on *Macrobrachium* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), cultured in Taiwan. J. Fish Dis. 22, 71-75.

Wang,C.S. and Chang,J.S. 2006. RT-PCR amplification and sequence analysis of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) associated with white tail disease of M. rosenbergii (de Man) cultured in Taiwan. Life Science, National University of Kaohsiung, Kaohsiung, Taiwan.

Widada,JR., Durand,S., Cambournac,I., Qian,D., Shi,Z.,Dejonghe,E., Richard,V. and Bonami,J.R. 2003. Genome-based detection methods of Macrobrachium rosenbergii nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii dot-blot, in situ hybridization and RT-PCR. J. Fish Dis. 26 (10), 583-590.

Widada,J.S. and Bonami,J.R. 2004. Characteristics of the monocistronic genome of extra small virus, a virus-like particle associated with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: possible candidate for a new species of satellite virus. J. Gen. Virol. 85 (Pt 3), 643-646.

Wang,C.S. and Chang, 2006. J.S. RT-PCR amplification and sequence analysis of Macrobrachium rosenbergii nodavirus and extra small virus (XSV) associated with white tail disease of *M. rosenbergi*i (de Man) cultured in Taiwan. Life Science, National University of Kaohsiung, Kaohsiung, Taiwan.

Yoganandhan, K., Widada, J.S., Bonami, J.R. and Sahul Hameed As. 2005. Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one step multiplex RT-PCR assay. J. of Fish Dis. 28, 65-69.

Zhang,H. and Shi,Z.2004. Determining of Macrobrachium rosenbergii nodavirus RNA3 fragment. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, 44 Xiao Hong Shan, Wuhan, Hubei.

Zhang H., Wang J., Yuan J., Li L., Zhang J., Bonami, JR., Shi Z. 2006. Quantitative relationship of two virus (*Mr*NV and XSV) in white-tail disease of *Macrobrachium rosenbergii.* Dis Aquat Org. 71(1): 11-7.