



การตายของลูกกุ้งก้ามกรามจากการติดเชื้อ

Macrobrachium rosenbergii nodavirus และ Extra small virus

Mass Mortalities of *Macrobrachium rosenbergii* Larvae Associated with

Macrobrachium rosenbergii Nodavirus and Extra Small Virus Infection

จारी พลชนะ

Jaree Polchana

สมเกียรติ์ กาญจนาคาร

Somkiat Kanchanakhan

สุดา ตัณฑวณิช

Suda Tandavanitj

วรวุฒิ สุขเจริญ

Worawut Sookcharoen

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

Inland Fisheries Research and Development Bureau

กรมประมง

Department of Fisheries

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Ministry of Agriculture and Cooperatives



การตายของลูกกุ้งก้ามกรามจากการติดเชื้อ

Macrobrachium rosenbergii nodavirus และ Extra small virus

Mass Mortalities of *Macrobrachium rosenbergii* Larvae Associated with
Macrobrachium rosenbergii Nodavirus and Extra Small Virus Infection

จารี พลชนะ

Jaree Polchana

สมเกียรติ์ กาญจนาคาร

Somkiat Kanchanakhan

สุดา ตัณฑวนิช

Suda Tandavanitj

วรวุฒิ สุขเจริญ

Worawut Sookcharoen

สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด

Inland Aquatic Animal Health Research Institute

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

Inland Fisheries Research and Development Bureau

กรมประมง

Department of Fisheries

๒๕๔๘

2549

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 49-0508-49180

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	3
วิธีดำเนินการ	4
ผลการศึกษา	7
สรุปและวิจารณ์ผล	14
คำขอขอบคุณ	16
เอกสารอ้างอิง	17
ภาคผนวก	18

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Primer ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ <i>M_rNV</i> และ XSV	5
2	ส่วนประกอบใน PCR master mix	5
3	ผลการตรวจเชื้อ <i>M_rNV</i> และ XSV ในลูกกึ่งก้ามกรามโดยเทคนิค RT-PCR	7
4	ผลการตรวจเชื้อ <i>M_rNV</i> และ XSV จากพ่อแม่พันธุ์และลูกกึ่งก้ามกรามแต่ละชุดโดยเทคนิค RT-PCR	8
5	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ <i>M_rNV</i> ที่ตรวจพบกับข้อมูลใน GenBank	9
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ XSV ที่ตรวจพบกับข้อมูลใน GenBank	9
ตารางผนวกที่		
1	ผลการตรวจโรคในลูกกึ่งก้ามกราม	18
2	ผลการตรวจเชื้อไวรัส <i>M_rNV</i> และ XSV ในพ่อแม่พันธุ์และลูกกึ่งก้ามกรามแต่ละชุดโดยวิธี RT-PCR	21

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตัวอย่างลูกกึ่งก้ามกรามที่ตรวจสอบเชื้อ <i>MfNV</i> และ <i>XSV</i> โดยเทคนิค RT-PCR	10
2	ตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์กึ่งก้ามกรามที่ตรวจพบเชื้อ <i>MfNV</i> และ <i>XSV</i>	10
3	การตรวจสอบเชื้อ <i>MfNV</i> และ <i>XSV</i> ในลูกกึ่งก้ามกรามป่วยโดยวิธี RT-PCR	11
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ <i>MfNV</i> ที่ตรวจพบเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank	11
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ <i>XSV</i> ที่ตรวจพบเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank	12
6	พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกึ่งก้ามกราม	13
7	อนุภาคของเชื้อไวรัสที่แยกจากลูกกึ่งก้ามกรามป่วยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	13

การตายของลูกกุ้งก้ามกรามจากการติดเชื้อ

Macrobrachium rosenbergii nodavirus และ Extra small virus

จारी ผลชนะ* สมเกียรติ์ กาญจนาคาร สุดา ตัณฑวณิช และ วรวิทย์ สุขเจริญ
สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง

บทคัดย่อ

ตั้งแต่ปี 2548 เป็นต้นมาการผลิตลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยประสบปัญหาไม่สามารถอนุบาลลูกกุ้งได้สำเร็จ โดยลูกกุ้งที่อายุได้ประมาณ 10 วันขึ้นไปอ่อนแอ ไม่กินอาหาร และมีอัตราการตายสูงถึง 50-90 เปอร์เซ็นต์ การตรวจวินิจฉัยโรคทางพยาธิสภาพของลูกกุ้งพบ Basophilic cytoplasmic inclusion ในตับและตับอ่อน การศึกษาทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคไวรัสรูปหกเหลี่ยมแบบ Icosahedral สองขนาดคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 27 และ 15 นาโนเมตร และการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR พบเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) และ Extra small virus (XSV) เมื่อนำชิ้นส่วนชิ้นที่ได้รับการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดไปโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MrNV และ XSV ใน GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกันถึง 99 % จากการตรวจสอบลูกกุ้งป่วยและพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ พบว่ามีชิ้นของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดแฝงอยู่ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการป่วยและตายของลูกกุ้งก้ามกราม และพ่อแม่พันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อก็อาจเป็นพาหะนำโรคไปสู่ลูกกุ้งได้

คำสำคัญ: กุ้งก้ามกราม MrNV, XSV

Mass Mortalities of *Macrobrachium rosenbergii* Larvae Associated with *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and Extra Small Virus Infection

Jaree Polchana* Somkiat Kanchanakhan Suda Tandavanitj and Worawut Sookcharoen

Inland Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries

Abstract

Since 2005, the production of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) larvae in Thailand has been seriously lost due to mass mortalities of the larvae aging 10 days or more. The affected larvae became weak, did not response to the feed and had 50-90 % mortalities. Histopathological changes in affected larvae were predominantly characterized by basophilic cytoplasmic inclusions in hepatopancreas. Electron micrographs revealed icosahedral viral particles at two different sizes, 27 and 15 nm in diameter. Both viruses were identified as *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and Extra small virus (*XSV*) as detected using RT-PCR. The RT-PCR products obtained were then cloned and sequenced. Comparisons of *MrNV* and *XSV* nucleotide sequences found 99 % homology to the known sequences of *MrNV* and *XSV* published in GenBank. Both viruses seem to associate with the clinical signs and mortalities as most affected larvae specimens showed positive RT-PCR. The *MrNV* and *XSV* were also detected in healthy brooders that may act as carriers.

Keywords: *Macrobrachium rosenbergii*, *MrNV*, *XSV*

คำนำ

กุ้งก้ามกรามที่ผลิตได้ในประเทศไทยประมาณร้อยละ 70 ใช้บริโภคภายในประเทศ ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 30 ส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง โดยกลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ (2549) รายงานว่าในปี 2545 ไทยส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งก้ามกรามปริมาณ 2,099 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 500 ล้านบาท ตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ สหรัฐอเมริกา จีน ออสเตรเลีย สิงคโปร์ และเกาหลี เป็นต้น นอกจากนี้ประเทศไทยยังส่งลูกกุ้งก้ามกรามไปจำหน่ายยังต่างประเทศปีละจำนวนมาก อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการผลิตลูกกุ้งก้ามกรามมักประสบปัญหาการระบาดของโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะตั้งแต่ปี 2548 เป็นต้นมา ผู้ประกอบการโรงเพาะฟักส่วนใหญ่ไม่สามารถอนุบาลลูกกุ้งให้รอดถึงระยะคว่ำได้ โดยลูกกุ้งเมื่อมีอายุได้ 10 วัน ขึ้นไปมีอัตราการกินอาหารลดลง อ่อนแอ และตายอย่างรวดเร็วประมาณ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ปัญหาการตายของลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักนอกจากพบในประเทศไทยแล้ว ยังมีรายงานในประเทศ French West Indies สาธารณรัฐโดมินิกัน จีน ไต้หวัน และอินเดีย แต่ปัญหาการตายมักเกิดกับลูกกุ้งระยะหลังคว่ำ (Post larvae) อาการที่พบ คือ ลูกกุ้งมีกล้ามเนื้อขาวขุ่น โดยเริ่มจากส่วนหางแล้วขยายไปจนถึงส่วนหัว และมีอัตราการตายสูงถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์ (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sahul Hameed, 2005) จากการศึกษาพบว่าลูกกุ้งก้ามกรามที่มีอาการดังกล่าวมีการติดเชื้อไวรัส *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) และ Extra small virus (XSV) (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Bonami *et al.*, 2005) ซึ่ง MrNV จัดเป็น RNA virus ที่มีรูปร่างแบบ Icosahedral ไม่มี Envelope อนุภาคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 26-27 นาโนเมตร มีการเพิ่มจำนวนใน Cytoplasm ของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันตามเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ส่วน XSV นั้นเป็น Satellite virus ที่มีอนุภาคขนาดเล็กมากประมาณ 14-16 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมชนิด RNA รูปร่างแบบ Icosahedral และไม่มี Envelope เช่นเดียวกัน (Bonami *et al.*, 2005) ดังนั้น เพื่อให้การแก้ปัญหาความเสียหายที่เกิดกับลูกกุ้งก้ามกรามในประเทศไทยเป็นไปอย่างถูกต้องและเหมาะสม จึงจำเป็นต้องศึกษาสาเหตุการตายของลูกกุ้งดังกล่าว เพื่อจะได้หาแนวทางในการป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสัมพันธ์ของการพบเชื้อไวรัส MrNV และ XSV กับการป่วยและตายของลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก
2. ศึกษาความสัมพันธ์ของการพบเชื้อไวรัส MrNV และ XSV ในพ่อแม่พันธุ์กับในลูกกุ้งก้ามกราม
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อลูกกุ้งก้ามกรามที่พบเชื้อไวรัส MrNV และ XSV

วิธีดำเนินการ

1. ตัวอย่างกึ่งกัมกราม

รวบรวมตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์และลูกกึ่งกัมกราม พร้อมทั้งบันทึกข้อมูลการตายของลูกกึ่งจากโรงเพาะฟักทั้งของเอกชนและหน่วยงานของกรมประมงในจังหวัดเพชรบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี อ่างทอง ลพบุรี ชลบุรี ระยอง ร้อยเอ็ด และอุดรธานี ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2548 ถึง กุมภาพันธ์ 2549 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ และตรวจสอบเชื้อไวรัส *MnNV* และ *XSV* โดยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2. การตรวจสอบเชื้อไวรัส *MnNV* และ *XSV* ในกึ่งกัมกรามโดยเทคนิค RT-PCR

นำตัวอย่างกึ่งกัมกรามมาตรวจสอบเชื้อไวรัส *MnNV* และ *XSV* โดยการตรวจยีนของเชื้อไวรัสดังกล่าวด้วยเทคนิค RT-PCR ดัดแปลงจากวิธีของ Sahul Hameed *et al.* (2004b)

2.1 การเตรียมตัวอย่าง RNA

ใช้ตัวอย่างลูกกึ่งกัมกรามจำนวน 57 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างมาจากลูกกึ่งจำนวน 150 ตัว และใช้ตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์กึ่งกัมกรามจำนวน 18 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างมาจากขาวว่ายน้ำพ่อแม่พันธุ์จำนวน 60 ตัว ตัวอย่างละประมาณ 25-50 มิลลิกรัม บดใน TRI-Reagent 500 ไมโครลิตร (หากตัวอย่างดังกล่าวมีน้ำหนักมากกว่า 50 มิลลิกรัม ให้บด ใน TN buffer (0.02 M Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4) ประมาณ 1: 2 (น้ำหนัก: ปริมาตร) แล้วดูดสารละลายตัวอย่าง 75 ไมโครลิตร มาผสมกับ TRI-Reagent 500 ไมโครลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติมคลอโรฟอร์มจำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ 20 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที จากนั้นจึงนำมาปั่นที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสชั้นบน 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ที่มี 2-propanol 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ก่อนที่จะปั่นที่ 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที แล้วปั่นล้างตะกอน RNA ด้วย Ethanol 75 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร ที่ 7,500 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที ผึ่งตะกอน RNA ให้แห้งแล้วละลาย RNA ด้วย Diethylpyrocarbonate (DEPC) treated distilled water 200 ไมโครลิตร

2.2 การเพิ่มปริมาณ DNA (PCR amplification)

เตรียมสารละลายในการทำ PCR (PCR master mix) โดยใช้ Primer สำหรับตรวจสอบเชื้อ *MnNV* และ *XSV* (ตารางที่ 1) และ SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) Cat. No. 12574-026 ในสัดส่วนตามตารางที่ 2

ตารางที่ 1 Primer ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ MrNV และ XSV

	Primer sequence	Reference	PCR product
MrNV F	5' GCG TTA TAG ATG GCA CAA GG 3'	Sahul Hameed <i>et al.</i> (2004a)	425 bp
MrNV R	5' AGC TGT GAA ACT TCC ACT GG 3'		
XSV F	5' GGA GAA CCA TGA GAT CAC G 3'	Sri Widada <i>et al.</i> (2004)	507 bp
XSV R	5' CTG CTC ATT ACT GTT CGG AGT 3'		

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบใน PCR master mix ที่มีสารละลายทั้งหมด 25 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
RNase-free water	8.5
2 X Reaction mix	12.5
10 μ M forward primer	1
10 μ M reverse primer	1
SuperScript TM III RT/Platinum Taq mix	1
Template RNA	1

ขบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ตามโปรแกรมดังนี้

- Reverse transcription	55 °C	30	Min
- Initial PCR activation step	94 °C	2	Min
- Main cycle (40 cycles)			
Denaturation	94 °C	15	Sec
Annealing	58 °C	30	Sec
Extension	68 °C	1	Min
- Final extension	68 °C	5	Min

2.3 การอ่านผล

นำ PCR product มาผ่านใน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ระยะเวลาประมาณ 50 นาที แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide และตรวจดูแถบ DNA เป้าหมาย โดยสังเกตการเรืองแสงภายใต้ UV transilluminator

3. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ *MrNV* และ *XSV*

นำ PCR product จากตัวอย่างกึ่งก้ำกวมที่ตรวจพบชิ้นส่วนยีนของเชื้อ *MrNV* และ *XSV* ไปทำโคลนนิ่ง และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศูนย์เทคโนโลยี ดิเอ็นเอ และจีโนมิกส์ แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *MrNV* และ *XSV* ที่ปรากฏใน GenBank

4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างกึ่งก้ำกวมมาดองในน้ำยา Davidson อัตราส่วน 1:20 ขึ้นไป เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนน้ำยาเป็น Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างกึ่งก้ำกวมไปผ่านขบวนการ Embedding ในพาราฟิน และตัดด้วย Microtome ให้เนื้อเยื่อมีความหนาประมาณ 5 ไมครอน แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin และศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัส

นำตัวอย่างกึ่งก้ำกวมป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *MrNV* และ *XSV* โดยวิธี RT-PCR มาดองในสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) บั่นที่ความเร็ว 1,400 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาปั่นครั้งที่สองที่ความเร็ว 10,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 25 นาที แล้วนำส่วนใสมาปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 100,000 x g เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ละลายตะกอนไวรัสด้วยสารละลาย PBS เพื่อศึกษารูปร่างอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) ที่ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการตรวจเชื้อ *MrNV* และ *XSV* ในกึ่งก้ำกวมโดยวิธี RT-PCR มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อไวรัส *MrNV* และ *XSV* กับการป่วยของลูกกึ่งก้ำกวม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อไวรัส *MrNV* และ *XSV* ในพ่อแม่พันธุ์กับในลูกกึ่งก้ำกวม โดยทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Yates' correction และ Fisher's Exact Test ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรม Epi Info (Cameron, 2002)

ผลการศึกษา

1. การศึกษาความสัมพันธ์ของการพบเชื้อไวรัส *MnNV* และ *XSV* กับการป่วยและตายของลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟัก

ลูกกุ้งก้ามกรามที่นำมาตรวจเชื้อ *MnNV* และ *XSV* โดยการตรวจสอบยีนของเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR และศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ เป็นลูกกุ้งที่มีอายุต่าง ๆ กันตั้งแต่ 4-40 วัน จำนวน 57 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างที่สุ่มจากบ่อที่ลูกกุ้งมีประวัติป่วย จำนวน 34 ตัวอย่าง จำแนกเป็นตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัส *MnNV* หรือ *XSV* ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสองชนิด จำนวน 27 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด จำนวน 7 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่สุ่มจากบ่อที่ลูกกุ้ง ไม่มีประวัติป่วย จำนวน 23 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบและไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 5 และ 18 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยลูกกุ้งที่แสดงอาการป่วยและตรวจพบเชื้อ *MnNV* หรือ *XSV* เมื่ออายุได้ประมาณ 10 วันขึ้นไปมีอัตราการกินอาหารลดลง สีซีดอ่อนแอ และตายอย่างรวดเร็วประมาณ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ลูกกุ้งที่รอดตายอาจมีลักษณะตัวดำ หรือตัวซีด ดังแสดงในภาพที่ 1 เมื่อนำผลการตรวจมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับการป่วยของลูกกุ้งโดยใช้โปรแกรม Epi Info พบว่า Odds ratio หรือ OR (อัตราส่วนโอกาสของการพบเชื้อไวรัสในลูกกุ้งจากบ่อที่มีประวัติป่วย ต่ออัตราส่วนโอกาสของการพบเชื้อไวรัสในลูกกุ้งจากบ่อที่ไม่มีประวัติป่วย) มีค่าเท่ากับ 13.89 แสดงว่าเชื้อไวรัสที่พบมีอิทธิพลต่อการป่วยและตายของลูกกุ้งก้ามกราม สอดคล้องกับผลการทดสอบทางสถิติที่พบว่าเชื้อไวรัสที่พบมีความสัมพันธ์กับการป่วยและตายของลูกกุ้งเพราะ Yates corrected Chi square มีค่าเท่ากับ 16.26 ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจเชื้อ *MnNV* และ *XSV* ในลูกกุ้งก้ามกรามโดยเทคนิค RT-PCR

(OR = 13.89, OR ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % = 3.81-50.61, Yates corrected Chi square = 16.26, P-value = 0.00005)

ผลตรวจเชื้อไวรัส	ประวัติของลูกกุ้ง		รวม
	ป่วย	ไม่ป่วย	
พบ	27	5	32
ไม่พบ	7	18	25
รวม	34	23	57

หมายเหตุ ค่า OR มากกว่า 1 หมายความว่า การป่วยของลูกกุ้งก้ามกรามสัมพันธ์กับการพบเชื้อไวรัส

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการพบเชื้อไวรัส *MrNV* และ *XSV* ในพ่อแม่พันธุ์และลูกกึ่งกำมารวม

ผลการตรวจเชื้อ *MrNV* และ *XSV* จากพ่อแม่พันธุ์และลูกกึ่งกำมารวมแต่ละชุด โดยเทคนิค RT-PCR จำนวน 18 กลุ่มตัวอย่าง (ตารางที่ 4) พบว่าพ่อแม่พันธุ์ส่วนใหญ่ คือ จำนวน 14 ใน 18 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ *MrNV* และ *XSV* แต่สุขภาพแข็งแรงเป็นปกติ (ภาพที่ 2) และเมื่อนำลูกของพ่อแม่พันธุ์เหล่านี้ มาตรวจ พบว่ากลุ่มที่พ่อแม่พันธุ์ตรวจพบเชื้อไวรัส จำนวน 14 ตัวอย่างนั้นลูกที่ได้มีการตรวจพบทั้งไวรัส *MrNV* และ *XSV* จำนวน 7 ตัวอย่าง พบเฉพาะ *MrNV* จำนวน 3 ตัวอย่าง และไม่พบทั้ง *MrNV* และ *XSV* จำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่มที่พ่อแม่พันธุ์ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ลูกที่ได้ก็ไม่พบเชื้อไวรัสเช่นเดียวกัน เมื่อนำผลดังกล่าวมาทดสอบทางสถิติโดย Fisher's Exact Test พบว่าการตรวจพบเชื้อ *MrNV* และ *XSV* ในลูกกึ่งกำมารวมมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อ *MrNV* และ *XSV* ในพ่อแม่พันธุ์ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจเชื้อ *MrNV* และ *XSV* จากพ่อแม่พันธุ์และลูกกึ่งกำมารวมแต่ละชุดโดยเทคนิค RT-PCR (Fisher's Exact P-value = 0.02)

ผลตรวจเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์	ผลตรวจเชื้อไวรัสในลูกกึ่ง		รวม
	พบ	ไม่พบ	
พบ	10	4	14
ไม่พบ	0	4	4
รวม	10	8	18

3. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ *MrNV* และ *XSV*

PCR product ของเชื้อ *MrNV* และ *XSV* ขนาด 425 และ 507 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 3) จากตัวอย่างลูกกึ่งกำมารวมป่วยเมื่อนำไปโคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *MrNV* และ *XSV* ที่ปรากฏใน GenBank (ภาพที่ 4 และ 5) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ *MrNV* ที่ศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนใน Segment RNA-2 ของเชื้อ *MrNV* ใน GenBank รหัส AY222840 จาก French West Indies, รหัส AY231437 จากจีน และรหัส DQ189990 จากประเทศไทย เท่ากับ 99, 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 4) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *XSV* ที่ศึกษาในครั้งนี้พบที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บน Capsid protein gene ของเชื้อ *XSV* รหัส DG174318 จากจีน, รหัส AY247793 จาก French West Indies, รหัส DQ189991 จากไทย และรหัส AM114036 จากอินเดีย เท่ากับ 99, 96, 96 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ *MnNV* ที่ตรวจพบกับข้อมูลใน GenBank

รหัส	ที่มาของเชื้อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน
AY222840	French West Indies	418/422 (99%)
AY231437	China	403/421 (95%)
DQ189990	Thailand	280/281 (99%)

ตารางที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ *XSV* ที่ตรวจพบกับข้อมูลใน GenBank

รหัส	ที่มาของเชื้อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน
DG174318	China	504/507 (99%)
AY247793	French West Indies	491/507 (96%)
DQ189991	Thailand	459/475 (96%)
AM114036	India	407/414 (98%)

4. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ลูกกุ้งก้ามกรามป่วยและพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่มีสุขภาพแข็งแรงแต่ตรวจพบเชื้อ *MnNV* และ *XSV* โดยเทคนิค RT-PCR มี Basophilic cytoplasmic inclusion เกิดขึ้นในเซลล์ตับและตับอ่อน (ภาพที่ 6) โดยเฉพาะในลูกกุ้งป่วยพบ Inclusion ปริมาณมากกว่าในพ่อแม่พันธุ์

5. การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัส

ตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *MnNV* และ *XSV* โดยเทคนิค RT-PCR เมื่อแยกเชื้อไวรัสมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบไวรัสอนุภาครูปหกเหลี่ยมแบบ Icosahedral สองขนาดคือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 27 และ 15 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 1 ตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามที่ตรวจสอบเชื้อ *MtNV* และ *XSV* โดยเทคนิค RT-PCR

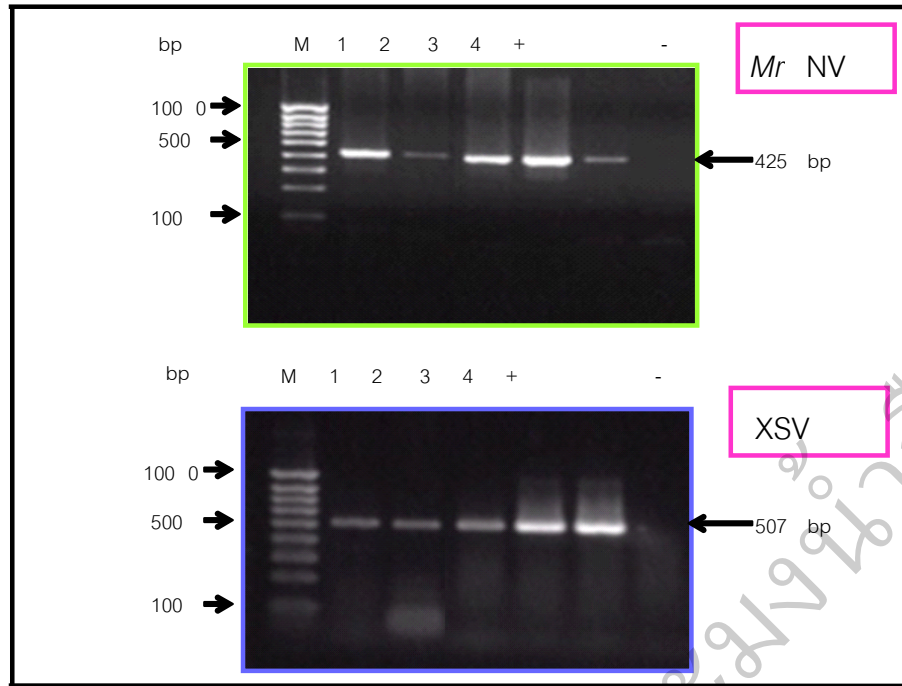
(ก = ลูกกุ้งปกติ และตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ;

ข = ลูกกุ้งที่กำลังป่วยและตายเป็นจำนวนมาก มีสีซีด และตรวจพบเชื้อไวรัส;

ค, ง = ลูกกุ้งที่รอดตายจากการป่วย มีลักษณะตัวดำ และตัวซีด และยังตรวจพบเชื้อไวรัส)



ภาพที่ 2 ตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่ตรวจพบเชื้อ *MtNV* และ *XSV* มีสุขภาพแข็งแรงเป็นปกติ



ภาพที่ 3 การตรวจสอบเชื้อ *MrNV* และ *XSV* ในลูกกึ่งก้ามกรามป่วยโดยวิธี RT-PCR ใน 1 % Agarose (M = Molecular marker; 1,2,3,4 = ตัวอย่างลูกกึ่งก้ามกรามป่วย; + = Positive control; - = Negative control)

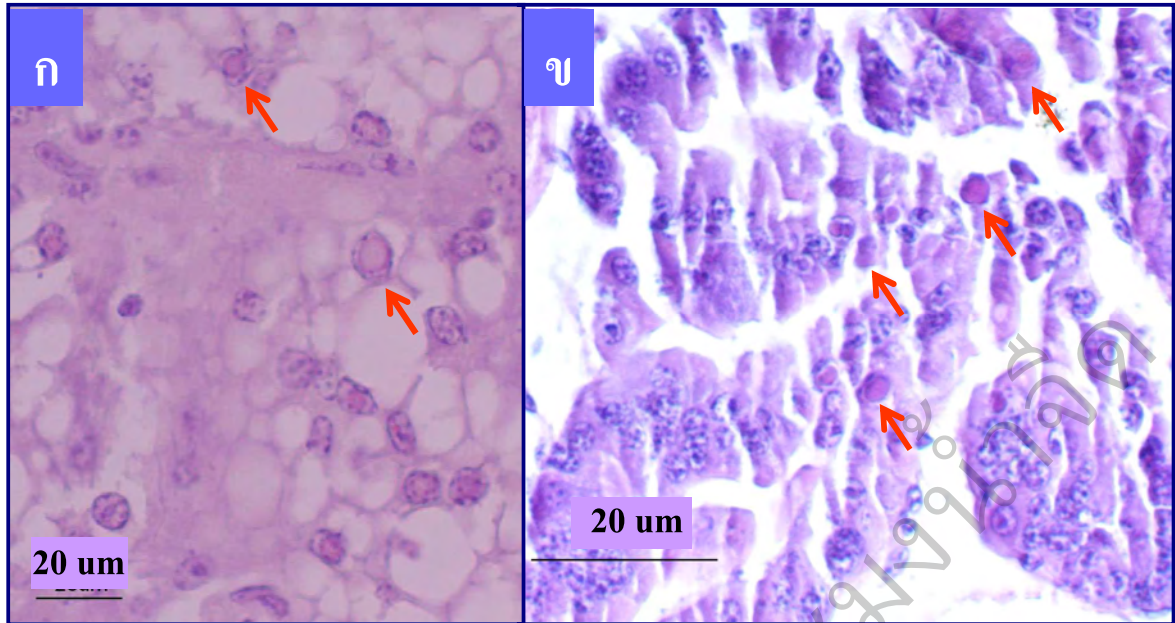
MrNV Thailand.gnu	1	-----GCGTTATAGATGGCACAAGGCTGCAGT	CAGATATGTTCCCTGC	42
AY222840 MrNV French West Indis.gnu	361	TCTATCGCAATTTTGGGAGCGTTATAGATGGCACAAGGCTGCAGT	TAGATATGTTCCCTGC	420
AY231437 MrNV China.gnu	324	TTTATCGCAATTTTGGGAGCGTTATAGATGGCACAAGGCTGCAGT	TAGATATGTTCCCTGC	383
DQ189990 MrNV Thailand.gnu	0	-----	-----	0
MrNV Thailand.gnu	43	AGTACCCAATACCTTAGCTTGC	CAACTTATTGGTTACATCGATACAGATCCACTAGATGA	102
AY222840 MrNV French West Indis.gnu	421	AGTACCCAATACCTTAGCTTGC	CAACTTATTGGTTACATCGATACAGATCCACTAGATGA	480
AY231437 MrNV China.gnu	384	CGTCCCTAATACCTTAGCTTGC	CAACTTATTGGTTACATCGATACAGATCCACTAGATGA	443
DQ189990 MrNV Thailand.gnu	0	-----	-----	0
MrNV Thailand.gnu	103	CCCTAACGTTATCCTCGATGTC	GATCAGTTACTTAGGCAGGCTACGTCACAAGTGGGTGC	162
AY222840 MrNV French West Indis.gnu	481	CCCTAACGTTATCCTCGATGTC	GATCAGTTACTTAGGCAGGCTACGTCACAAGTGGGTGC	540
AY231437 MrNV China.gnu	444	CCCTAACGTTATCCTCGATGTC	GATCAGTTACTTAGGCAGGCTACGTCACAAGTGGGTGC	503
DQ189990 MrNV Thailand.gnu	1	-----	GGCTACGTCACAAGTGGGTGC	21
MrNV Thailand.gnu	163	GGGGCAGTGGAAATTTCTCTGATACAACTATTCCATTGATTGTCAGGCGTGATGATCA		222
AY222840 MrNV French West Indis.gnu	541	GGGGCAGTGGAAATTTCTCTGATACAACTATTCCATTGATTGTCAGGCGTGATGATCA		600
AY231437 MrNV China.gnu	504	GGGACAGTGGAAATTTCTCTGATACAACTATTCCATTGATTGTCAGGCGTGATGATCA		563
DQ189990 MrNV Thailand.gnu	22	CCGCGCAGTGGAAATTTCTCTGATACAACTATTCCATTGATTGTCAGGCGTGATGATCA		81
MrNV Thailand.gnu	223	ATTGTAATACTTAGTCAAGATAAAGAGAA	GTCGTTTCTCTCAACAGGCGTGATTTTA	282
AY222840 MrNV French West Indis.gnu	601	ATTGTAATACTTAGTCAAGATAAAGAGAA	GTCGTTTCTCTCAACAGGCGTGATTTTA	660
AY231437 MrNV China.gnu	564	ATTGTAATACTTAGTCAAGATAAAGAGAA	GTCGTTTCTCTCAACAGGCGTGATTTTA	623
DQ189990 MrNV Thailand.gnu	82	ATTGTAATACTTAGTCAAGATAAAGAGAA	GTCGTTTCTCTCAACAGGCGTGATTTTA	141
MrNV Thailand.gnu	283	CCTCTTGCAGTCACTACACTACTTAATATTAGTGGTGAAGCCATTACAAATGATTTAAT		342
AY222840 MrNV French West Indis.gnu	661	CCTCTTGCAGTCACTACACTACTTAATATTAGTGGTGAAGCCATTACAAATGATTTAAT		720
AY231437 MrNV China.gnu	624	CCTCTTGCAGTCACTACACTACTTAATATTAGTGGTGAAGCCATTACAAATGATTTAAT		683
DQ189990 MrNV Thailand.gnu	142	CCTCTTGCAGTCACTACACTACTTAATATTAGTGGTGAAGCCATTACAAATGATTTAAT		201
MrNV Thailand.gnu	343	TTTCCAGTTTCACTATATTTAGATTGGGTC	TGTGGATTTTCCATGCCACAAATTAATCCCTAC	402
AY222840 MrNV French West Indis.gnu	721	TTTCCAGTTTCACTATATTTAGATTGGGTC	TGTGGATTTTCCATGCCACAAATTAATCCCTAC	780
AY231437 MrNV China.gnu	684	TTTCCAGTTTCACTATATTTAGATTGGGTC	TGTGGATTTTCCATGCCACAAATTAATCCCTAC	743
DQ189990 MrNV Thailand.gnu	202	TTTCCAGTTTCACTATATTTAGATTGGGTC	TGTGGATTTTCCATGCCACAAATTAATCCCTAC	261
MrNV Thailand.gnu	403	ACCAGTGGAAATTTCCACAGC	-----	422
AY222840 MrNV French West Indis.gnu	781	ACCAGTGGAAATTTCCACAGCTAACCTTCA	AATGCCGATACTATTGGCATTGGGTTCCACC	840
AY231437 MrNV China.gnu	744	ACCAGTGGAAATTTCCACAGCTAACCTTCA	AATGCCGATACTATTGGCATTGGGTTCCACC	803
DQ189990 MrNV Thailand.gnu	262	ACCAGTGGAAATTTCCACAGCTAACCTTCA	AATGCCGATACTATTGGCATTGGGTTCCACC	321

ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ *MrNV* ที่ตรวจพบเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank

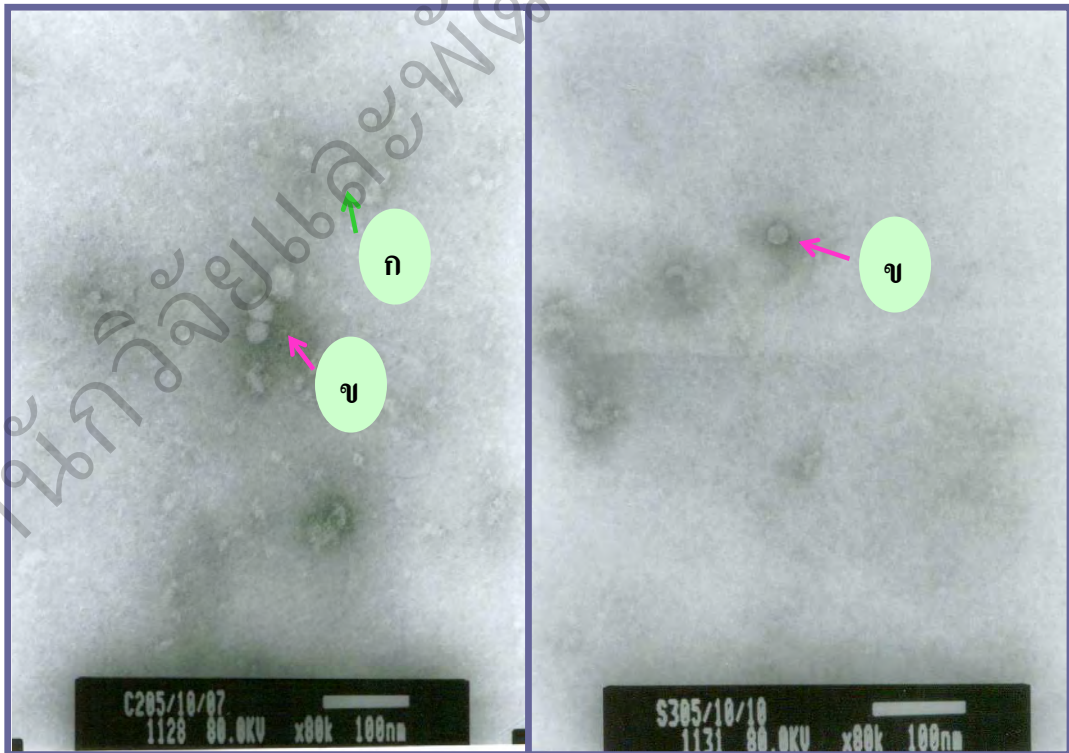
XSV Thailand.gnu	1	-----	GGAGAA	7
DQ189991 XSV Thailand.gnu	1	-----	SCATTAATAATAATCGGAGAAC	22
AY247793 XSV French West Indis.gnu	35	TGGTAATCGCTATTAATATTTCCAAACAACATGAATAAGC	SCATTAATAATAATCGGAGAAC	94
DG174318 XSV PR China.gnu	61	TGGTAATCGCTATTAATATTTCCAAACAACATGAATAAGC	SCATTAATAATAATCGGAGAAC	120
AM114036 India.gnu	0	-----	-----	0
XSV Thailand.gnu	8	CATGAGATCACGTAGGGGACG	GGTAGGACAATGGGATCTAATCTCATTCCCTTA	67
DQ189991 XSV Thailand.gnu	23	CATGAGATCACGTAGGGGACG	GGTAGGACAATGGGATCTAATCTCATTCCCTTA	82
AY247793 XSV French West Indis.gnu	95	CATGAGATCACGTAGGGGACG	GGTAGGACAATGGGATCTAATCTCATTCCCTTA	154
DG174318 XSV PR China.gnu	121	CATGAGATCACGTAGGGGACG	GGTAGGACAATGGGATCTAATCTCATTCCCTTA	180
AM114036 India.gnu	0	-----	-----	0
XSV Thailand.gnu	68	CTCACCAGTCCCTATACCATATACACCACCCGTTACCCAGTACCCTGATT	GTAAATCC	127
DQ189991 XSV Thailand.gnu	83	CTCACCAGTCCCTATACCATATACACCACCCGTTACCCAGTACCCTGATT	GTAAATCC	142
AY247793 XSV French West Indis.gnu	155	CTCACCAGTCCCTATACCATATACACCACCCGTTACCCAGTACCCTGATT	GTAAATCC	214
DG174318 XSV PR China.gnu	181	CTCACCAGTCCCTATACCATATACACCACCCGTTACCCAGTACCCTGATT	GTAAATCC	240
AM114036 India.gnu	1	-----	CACCGTTACCCAGTACCCTGATT	34
XSV Thailand.gnu	128	TCGGAAAACACTCTGGATTGACATTTGATCTTCAAGTGAAGAGTCCGGGATTT	TACATT	187
DQ189991 XSV Thailand.gnu	143	TCGGAAAACACTCTGGATTGACATTTGATCTTCAAGTGAAGAGTCCGGGATTT	TACATT	202
AY247793 XSV French West Indis.gnu	215	TCGGAAAACACTCTGGATTGACATTTGATCTTCAAGTGAAGAGTCCGGGATTT	TACATT	274
DG174318 XSV PR China.gnu	241	TCGGAAAACACTCTGGATTGACATTTGATCTTCAAGTGAAGAGTCCGGGATTT	TACATT	300
AM114036 India.gnu	35	TCGGAAAACACTCTGGATTGACATTTGATCTTCAAGTGAAGAGTCCGGGATTT	TACATT	94
XSV Thailand.gnu	188	GCACCGTTGGTTCATACCGTAAATAGGATCAC	AAACTTGGTCCATCTAAACCTAA	247
DQ189991 XSV Thailand.gnu	203	GCACCGTTGGTTCATACCGTAAATAGGATCAC	AAACTTGGTCCATCTAAACCTAA	262
AY247793 XSV French West Indis.gnu	275	GCACCGTTGGTTCATACCGTAAATAGGATCAC	AAACTTGGTCCATCTAAACCTAA	334
DG174318 XSV PR China.gnu	301	GCACCGTTGGTTCATACCGTAAATAGGATCAC	AAACTTGGTCCATCTAAACCTAA	360
AM114036 India.gnu	95	GCACCGTTGGTTCATACCGTAAATAGGATCAC	AAACTTGGTCCATCTAAACCTAA	154
XSV Thailand.gnu	248	TATTGAGAAGGTCGCAGCATAC	CTGCACCCAGGAGATTATAAGGTTGTTCTCAATGACTT	307
DQ189991 XSV Thailand.gnu	263	TATTGAGAAGGTCGCAGCATAC	CTGCACCCAGGAGATTATAAGGTTGTTCTCAATGACTT	322
AY247793 XSV French West Indis.gnu	335	TATTGAGAAGGTCGCAGCATAC	CTGCACCCAGGAGATTATAAGGTTGTTCTCAATGACTT	394
DG174318 XSV PR China.gnu	361	TATTGAGAAGGTCGCAGCATAC	CTGCACCCAGGAGATTATAAGGTTGTTCTCAATGACTT	420
AM114036 India.gnu	155	TATTGAGAAGGTCGCAGCATAC	CTGCACCCAGGAGATTATAAGGTTGTTCTCAATGACTT	214
XSV Thailand.gnu	308	TAAAACTGGTATAACAAGTCGTTGATGAAGGCTCTTATGCTCATAGAGCCG	CAGAGGAT	367
DQ189991 XSV Thailand.gnu	323	TAAAACTGGTATAACAAGTCGTTGATGAAGGCTCTTATGCTCATAGAGCCG	CAGAGGAT	382
AY247793 XSV French West Indis.gnu	395	TAAAACTGGTATAACAAGTCGTTGATGAAGGCTCTTATGCTCATAGAGCCG	CAGAGGAT	454
DG174318 XSV PR China.gnu	421	TAAAACTGGTATAACAAGTCGTTGATGAAGGCTCTTATGCTCATAGAGCCG	CAGAGGAT	480
AM114036 India.gnu	215	TAAAACTGGTATAACAAGTCGTTGATGAAGGCTCTTATGCTCATAGAGCCG	CAGAGGAT	274
XSV Thailand.gnu	368	TCTTTATCCACAGCTGCACAATAATTTACGGTATTTTACAGCAACAGGCACACT	CAACAC	427
DQ189991 XSV Thailand.gnu	383	TCTTTATCCACAGCTGCACAATAATTTACGGTATTTTACAGCAACAGGCACACT	CAACAC	442
AY247793 XSV French West Indis.gnu	455	TCTTTATCCACAGCTGCACAATAATTTACGGTATTTTACAGCAACAGGCACACT	CAACAC	514
DG174318 XSV PR China.gnu	481	TCTTTATCCACAGCTGCACAATAATTTACGGTATTTTACAGCAACAGGCACACT	CAACAC	540
AM114036 India.gnu	275	TCTTTATCCACAGCTGCACAATAATTTACGGTATTTTACAGCAACAGGCACACT	CAACAC	334
XSV Thailand.gnu	428	TATCACTACCACTGCTAAAGATCCAGTTCAGTGGTTCGTTGGTAAACATAT	TGGGA	487
DQ189991 XSV Thailand.gnu	443	TATCACTACCACTGCTAAAGATCCAGTTCAGTGGTTCGTTGGTAAACATAT	TGGGA	490
AY247793 XSV French West Indis.gnu	515	TATCACTACCACTGCTAAAGATCCAGTTCAGTGGTTCGTTGGTAAACATAT	TGGGA	574
DG174318 XSV PR China.gnu	541	TATCACTACCACTGCTAAAGATCCAGTTCAGTGGTTCGTTGGTAAACATAT	TGGGA	600
AM114036 India.gnu	335	TATCACTACCACTGCTAAAGATCCAGTTCAGTGGTTCGTTGGTAAACATAT	TGGGA	394
XSV Thailand.gnu	488	CTCCGAACAGTAAATGAGCAG	-----	507
DQ189991 XSV Thailand.gnu	490	CTCCGAACAGTAAATGAGCAG	-----	490
AY247793 XSV French West Indis.gnu	575	CTCCGAACAGTAAATGAGCAGGTTCTATGCTTCGAACTAAAAACA	SCAATGAGTTCTAGCT	634
DG174318 XSV PR China.gnu	601	CTCCGAACAGTAAATGAGCAGGTTCTATGCTTCGAACTAAAAACA	SCAATGAGTTCTAGCT	660
AM114036 India.gnu	395	CTCCGAACAGTAAATGAGCAGGTTCTATGCTTCGAACTAAAAACA	-----	438

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ XSV ที่ตรวจพบเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank

สำนักวิจัยเทคโนโลยี



ภาพที่ 6 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่ก้ำกวมพบ Basophilic cytoplasmic inclusion บริเวณตับและตับอ่อน (ก = พอมแม่พันธุ์; ข = ลูกกึ่ง)



ภาพที่ 7 อนุภาคของเชื้อไวรัสที่แยกจากลูกกึ่งก้ำกวมป่วยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ก = อนุภาคไวรัสขนาด 15 นาโนเมตร; ข = อนุภาคไวรัสขนาด 27 นาโนเมตร)

สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *MnNV* และ *XSV* ที่ตรวจพบมีความสัมพันธ์กับการป่วยของลูกกุ้งก้ามกราม กรณีบางตัวอย่างที่ผลการตรวจเชื้อไวรัสโดยวิธี RT-PCR เป็นบวกแต่ลูกกุ้งในบ่อไม่มีประวัติป่วย อาจเป็นเพราะ การเลี้ยงลูกกุ้งในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ได้รับอาหารที่เหมาะสม ทำให้ลูกกุ้งมีความแข็งแรงและสามารถต้านทานโรคได้ หรือเชื้อไวรัสอาจมีความรุนแรงไม่สูงพอที่จะทำให้กุ้งเกิดโรคได้ในทางตรงกันข้ามมีบางตัวอย่างที่ผลการตรวจไวรัสเป็นลบแต่ลูกกุ้งในบ่อมีประวัติป่วย อาจเป็นเพราะว่าการป่วยของลูกกุ้งเหล่านั้นเกิดจากปัจจัยอื่น เช่น ปัจจัยด้านคุณภาพน้ำ หรือการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ หรืออาจเนื่องมาจากการสู่มตัวอย่างไม่ได้สู่มในขณะที่ลูกกุ้งกำลังป่วยหรือตายเป็นจำนวนมาก แต่ทำการสู่มหลังจากที่ลูกกุ้งส่วนใหญ่ตายไปแล้ว ลูกกุ้งส่วนที่รอดเพียงจำนวนน้อยและสู่มมาตรวจจึงอาจเป็นตัวที่แข็งแรงและไม่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาเบื้องต้นที่สู่มตัวอย่างลูกกุ้งจากบ่อเดียวกันเป็นระยะ ๆ แล้วพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *MnNV* และ *XSV* ในลูกกุ้งอายุ 4-5 วันที่ยังไม่แสดงอาการป่วย จนถึงอายุ 16-17 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่ลูกกุ้งกำลังป่วย แต่หลังจากที่ลูกกุ้งบ่อนั้นตายไปแล้วเป็นจำนวนมากการตรวจพบเชื้อไวรัสมีแนวโน้มลดลง การตรวจพบเชื้อ *MnNV* หรือ *XSV* ในลูกกุ้งถึงแม้จะไม่ได้ช่วยแก้ปัญหาการป่วยของลูกกุ้งในบ่อ นั้น ๆ ในขณะนั้น เนื่องจากเชื้อไวรัสสองชนิดนี้มีการเจริญและเพิ่มจำนวนอยู่ใน Cytoplasm ของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันตามอวัยวะต่าง ๆ เกือบทุกส่วนของลูกกุ้ง (Bonami *et al.*, 2005) การใส่ยาหรือสารเคมีเพื่อการรักษาจึงเป็นไปได้ยาก แต่ผลการตรวจสามารถใช้เป็นข้อมูลในการจัดการและการตัดสินใจกรณีต้องการนำลูกกุ้งไปเลี้ยงต่อเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ เพราะโรคนี้สามารถป้องกันได้โดยระมัดระวังไม่ให้มีการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสจากบ่อหนึ่งไปสู่อีกบ่อหนึ่งโดยการสัมผัสผ่านทางน้ำ หรือการใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ ร่วมกันโดยปราศจากการฆ่าเชื้อ การไม่ปล่อยให้ลูกกุ้งกินซากของกุ้งที่ติดเชื้อ *MnNV* หรือ *XSV* และการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสจากพ่อแม่ไปสู่ลูกกุ้ง ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าการติดเชื้อ *MnNV* และ *XSV* ในลูกกุ้งก้ามกรามมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อในพ่อแม่พันธุ์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Sahul Hameed *et al.* (2004b) ที่ตรวจพบเชื้อ *MnNV* และ *XSV* ในเนื้อเยื่อบริเวณรังไข่ของแม่กุ้งก้ามกรามโดยเทคนิค RT-PCR จึงรายงานว่าการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวมีโอกาสถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูกกุ้งได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันความเสียหายของลูกกุ้งก้ามกรามอันเนื่องจากการติดเชื้อ *MnNV* และ *XSV* เกษตรกรควรลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคโดยเลือกพ่อแม่พันธุ์จากแหล่งที่เชื่อถือได้ หรือมีการตรวจสอบก่อนว่าเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัส

ลักษณะอาการของลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อ *MnNV* และ *XSV* ส่วนใหญ่เริ่มแสดงออกเมื่ออายุได้ประมาณ 10 วันขึ้นไปและยังไม่คว่ำ มีอัตราการกินอาหารลดลง สีซีด อ่อนแอ และมีอัตราการตายสูงประมาณ 50-90 เปอร์เซ็นต์ในช่วงเวลา 4-5 วันหลังจากเริ่มแสดงอาการ สำหรับในบ่อที่มีอาการรุนแรงพบว่าลูกกุ้งบางส่วนมีระยะพักขาดกร่อนร่วมด้วย และมีอัตราการตายสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ในช่วงเวลา 2-3 วัน ซึ่งแตกต่างจากรายงานในประเทศไต้หวัน และอินเดีย ที่พบว่าปัญหาการตายเนื่องจากเชื้อ *MnNV* และ *XSV* มักเกิดกับลูกกุ้งระยะหลังคว่ำ มีลักษณะกล้ามเนื้อขาวขุ่น โดยเริ่มจากส่วนหางแล้วขยายไปจนถึงส่วนหัว และมี

อัตราการตายสูงถึง 90-100 เปอร์เซนต์ (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sahul Hameed, 2005) แต่จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของลูกกุ้งป่วยพบว่า มี Basophilic cytoplasmic inclusion เกิดขึ้นในเซลล์ตับและตับอ่อนเป็นจำนวนมากเช่นเดียวกับในลูกกุ้งก้ามกรามกล้ามเนื้อขาวขุ่นในประเทศ French West Indies ที่รายงานโดย Arcier *et al.* (1999)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วนยีนของเชื้อ MrNV และ XSV พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนของเชื้อที่พบในประเทศจีน อินเดีย French West Indies และไทย ถึง 95-99 เปอร์เซนต์ เป็นการยืนยันว่าชิ้นส่วนยีนที่ตรวจพบเป็นชิ้นส่วนยีนของเชื้อ MrNV และ XSV อีกทั้งการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนก็พบเชื้อไวรัสอนุภาครูปหกเหลี่ยม 2 ขนาด คือ 27 และ 15 นาโนเมตรเช่นเดียวกับการศึกษาของ Qian *et al.* (2003) และ Bonami *et al.* (2005) ในประเทศจีน และ French West Indies อย่างไรก็ตามการศึกษากครั้งนี้ได้เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ MrNV และ XSV เพียงบางส่วนเท่านั้น ในขณะที่ยีนทั้งหมดของเชื้อ MrNV ประกอบด้วย 2 Segment ได้แก่ RNA-1 และ RNA-2 มีขนาด 2.9 และ 1.3 kb ตามลำดับ ส่วน XSV ประกอบด้วยยีนขนาด 0.9 kb (Bonami *et al.*, 2005) ดังนั้นการศึกษานี้ต่อไปจึงควรศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดบนยีนของเชื้อ MrNV และ XSV เพื่อจะได้ทราบถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อที่พบในประเทศไทย และในประเทศอื่น ๆ อีกทั้งยังเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาระบาดวิทยาของโรคนี้ต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ประกอบการ โรงเพาะฟักกุ้งก้ามกรามทั้งเอกชนและหน่วยงานของกรมประมง ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในครั้งนี้

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ. 2549. การส่งออกปลาน้ำจืดปี 2545.

www.export_fishwater2545.htm. กรมประมง, กรุงเทพฯ ฯ.

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

Bonami, J.R., Z. Shi, D. Qian and J. Sri Widada. 2005. White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of Nodavirus. J. Fish Dis. 28(1): 23-32.

Cameron, A. 2002. Survey Toolbox for Aquatic Animal Diseases. Australian Center for International Agricultural Research, Canberra, Australia. 375 pp.

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

Sahul Hameed, A.S. 2005. White Tail Disease-Disease Card. Developed to support the NACA/FAO/OIE regional quarterly aquatic animal disease (QAAD) reporting system in the Asia-Pacific. NACA, Bangkok, Thailand. 7 pp.

Sahul Hameed, A.S., K. Yoganandhan, J. Sri Widada and J.R. Bonami. 2004a. Studies on the occurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* in India. Aquaculture. 238: 127-133.

Sahul Hameed, A.S., K. Yoganandhan, J. Sri Widada and J.R. Bonami. 2004b. Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and its associated extra small virus (XSV). Dis. Aquat. Org. 62: 191-196.

Sri Widada, J., V. Richard, Z. Shi, D. Qian and J.R. Bonami. 2004. Dot-blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV) associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Dis. Aquat. Org. 58: 83-87.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ผลการตรวจโรคในลูกกึ่งกำกรม (+ = พบ; - = ไม่พบ; NA = Not analysis
(ไม่ได้ทดสอบ))

ลำดับ	ประวัติการป่วย ของลูกกึ่งในบ่อ	อายุลูกกึ่งที่ เริ่มป่วย (วัน)	อายุลูกกึ่ง ที่สุ่ม (วัน)	ผลตรวจไวรัสโดยวิธี RT-PCR		พยาธิ สภาพ
				<i>MrNV</i>	XSV	
1	ไม่ป่วย		15	-	-	-
2	ไม่ป่วย		15	-	-	NA
3	ไม่ป่วย		15	-	-	NA
4	ไม่ป่วย		17	-	-	NA
5	ไม่ป่วย		18	-	-	NA
6	ไม่ป่วย		18	-	-	NA
7	ไม่ป่วย		20	-	-	-
8	ไม่ป่วย		20	-	-	NA
9	ไม่ป่วย		20	-	-	NA
10	ไม่ป่วย		20	-	-	NA
11	ไม่ป่วย		20	-	-	NA
12	ไม่ป่วย		20	-	-	NA
13	ไม่ป่วย		22	-	-	NA
14	ไม่ป่วย		23	-	-	NA
15	ไม่ป่วย		23	-	-	NA
16	ไม่ป่วย		23	+	-	NA
17	ไม่ป่วย		23	-	-	NA
18	ไม่ป่วย		25	-	-	NA
19	ไม่ป่วย		25	-	-	NA
20	ไม่ป่วย		28	+	+	NA
21	ไม่ป่วย		28	+	-	NA
22	ไม่ป่วย		30	+	-	NA
23	ไม่ป่วย		40	+	+	NA

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	ประวัติการป่วย ของลูกกึ่งในบ่อ	อายุลูกกึ่งที่ เริ่มป่วย (วัน)	อายุลูกกึ่ง ที่สู่ม (วัน)	ผลตรวจไวรัสโดยวิธี RT-PCR		พยาธิ สภาพ
				MNV	XSV	
24	ป่วย	12	15	+	+	+
25	ป่วย	12	22	-	-	-
26	ป่วย	12	12	+	+	+
27	ป่วย	13	18	+	+	NA
28	ป่วย	13	20	+	+	NA
29	ป่วย	14	19	+	+	NA
30	ป่วย	14	14	+	+	+
31	ป่วย	14	25	-	-	NA
32	ป่วย	14	20	+	+	NA
33	ป่วย	15	22	+	-	NA
34	ป่วย	15	25	-	-	NA
35	ป่วย	15	19	+	+	NA
36	ป่วย	15	10	-	+	NA
37	ป่วย	15	24	-	-	NA
38	ป่วย	15	18	+	+	NA
39	ป่วย	15	5	+	+	NA
40	ป่วย	15	4	+	+	NA
41	ป่วย	15	22	+	+	NA
42	ป่วย	15	21	-	+	NA
43	ป่วย	15	27	+	-	NA
44	ป่วย	15	17	+	-	NA
45	ป่วย	16	4	+	+	NA
46	ป่วย	16	16	+	+	NA
47	ป่วย	16	5	+	+	NA
48	ป่วย	16	17	+	+	NA
49	ป่วย	16	20	+	-	NA

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	ประวัติการป่วย ของลูกกึ่งในบ่อ	อายุลูกกึ่งที่ เริ่มป่วย (วัน)	อายุลูกกึ่ง ที่สูม (วัน)	ผลตรวจไวรัสโดยวิธี RT-PCR		พยาธิ สภาพ
				MNV	XSV	
50	ป่วย	17	23	+	+	-
51	ป่วย	17	20	+	+	NA
52	ป่วย	17	19	-	+	NA
53	ป่วย	17	19	-	+	NA
54	ป่วย	18	15	+	-	NA
55	ป่วย	20	25	-	-	NA
56	ป่วย	20	22	-	-	NA
57	ป่วย	21	28	-	-	NA

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

ตารางผนวกที่ 2 ผลการตรวจเชื้อไวรัส *MrNV* และ *XSV* ในพ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้งก้ามกรามแต่ละชุดโดยวิธี RT-PCR (+ = พบ; - = ไม่พบ)

ลำดับ	ผลตรวจเชื้อไวรัสในลูกกุ้ง		ผลตรวจเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์	
	<i>MrNV</i>	<i>XSV</i>	<i>MrNV</i>	<i>XSV</i>
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	-	+	+
9	+	-	+	+
10	+	-	+	+
11	-	-	+	+
12	-	-	+	+
13	-	-	+	+
14	-	-	+	+
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-