# การตรวจและวินิจฉัยโรคติดเชื้ออิริโดไวรัสในจิ้งหรีด

**ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ์* ตวงทอง ปัจฉิมะศิริ นพพร โต๊ะมี มนทกานติ์ วงศ์ภากร**

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ 50 ถนนพหลโยธิน เกษตรกลาง แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทร. 0-2579-8908 ถึง 14 โทรสาร 0-2579-8918 ถึง 19 อีเมล์ thinnarats@dld.go.th

## บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรายงานการตรวจและวินิจฉัยโรคติดเชื้ออิริโดไวรัสในจิ้งหรีด (cricket iridovirus infection) ตัวอย่างจิ้งหรีดได้มาจากฟาร์มจิ้งหรีดจังหวัดลำพูน แสดงอาการป่วย ได้แก่ กินอาหารลดลง ไม่เคลื่อนไหว อัตราการป่วยประมาณ 100% และอัตราการตายประมาณ 30-40% ผลการตรวจภายนอก พบส่วนหัวมีขนาดเล็ก ส่วนคอยืดยาวออก ปีกสั้นกว่าปกติ และช่องท้องขยายใหญ่ ผลการตรวจภายใน พบของเหลวสีขาวขุ่นเป็นมันแวววาวอัดแน่นอยู่เต็มช่องท้อง เมื่อสัมผัสอากาศจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอ่อนๆ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบ basophilic intracytoplasmic inclusion body ในเซลล์ไขมัน ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน พบอนุภาคไวรัสจำนวนมากภายใน inclusion body ผลการตรวจด้วยวิธี PCR และ DNA sequencing ของ Major Capsid Protein (MCP) gene พบว่าเชื้อที่แยกได้คล้ายคลึงกับ cricket iridovirus (CrIV) ผลการชันสูตรจากประวัติ อาการ และผลทางห้องปฏิบัติการ บ่งชี้ว่าเกิดจากการติดเชื้อ CrIV ขั้นรุนแรง การศึกษาครั้งนี้เป็นการรายงานการพบโรคติดเชื้อ CrIV ครั้งแรกของประเทศไทย

**คำสำคัญ** : จิ้งหรีด, อิริโดไวรัส, cricket, iridovirus, CrIV

## บทนำ

อิริโดไวรัส (iridoviruses) ถูกจัดอยู่ใน family *Iridoviridae* เป็นไวรัสที่มี DNA สายคู่ (double-stranded DNA) มีลักษณะเด่น ได้แก่ อนุภาคไวรัสมีขนาดใหญ่ ซึ่งอยู่ระหว่าง 151-167 nm รูปร่างของอนุภาคเป็นแบบ icosahedral และ มีการเพิ่มจำนวนในไซโตพลาสซึมของเซลล์ มีรายงานแยกเชื้ออิริโดไวรัสจากแมลงใน order *Orthoptera* ได้แก่ จิ้งหรีด (mole cricket) (Boucias *et al*., 1987; Kleespies *et al*., 1999; Just and Essbauer, 2001) แมลงสาบ *Blattella germanica* และ *Blatta orientalis* นอกจากนี้ยังพบในแมลงศัตรูพืชและแมลงรำคาญหลายชนิด เช่น *Gryllus bimaculatus* L., African migratory locust (*Locusta migratoria migratorioides*) (Kleespies *et al*., 1999)

iridovirus แบ่งเป็น 5 genera ได้แก่ *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocystovirus* และ *Ranavirus* (ICTV, 2002) สปีชีส์ที่เป็นต้นแบบสำหรับ genus *Iridovirus* คือ insect iridescent virus type 6 (IIV-6 หรือ Chilo iridescent virus) (Bahr *et al*., 1997; Cerutti and Devauchelle, 1980, 1982, 1985) IIV-6 ถูกแยกได้จากแมลงชนิดหนึ่งที่เรียกว่า rice-stem borer (*Chilo suppressalis*) (Fukaya and Nasu, 1966) นอกจากนี้ยังพบว่าแมลงหลายชนิด เช่น ยุงก็สามารถติดเชื้อ IIV-6 ได้ด้วย (Fukuda, 1971) สำหรับโครงสร้างพันธุกรรมของ IIV-6 นั้นได้รับการถอดรหัสอย่างสมบูรณ์แล้ว (Jakob *et al*., 2001)

iridovirus ในจิ้งหรีด (cricket iridovirus, CrIV) ถูกแยกเชื้อได้ในปี พ.ศ. 2539 ในประเทศเนเธอร์แลนด์จากฟาร์มเลี้ยงจิ้งหรีด *Gryllus campestris L.* และ *Acheta domesticus L.* ซึ่งทั้งสองสปีชีส์นี้จัดอยู่ใน order *Orthoptera* family *Gryllidae* (Kleespies *et al*., 1999) จากการศึกษา CrIV ในแมลง order *Orthoptera* พบว่า CrIV สามารถติดต่อได้ทางการกิน (Anthony and Comps, 1991; Carter, 1973a, 1973b, 1974) ทำให้จิ้งหรีดตาย และมีอาการจำเพาะ ได้แก่ ช่องท้องขยายใหญ่ มีของเหลวสีขาวขุ่นเป็นมันแวววาวอัดแน่นอยู่เต็มช่องท้อง และเมื่อของเหลวนั้นถูกกับอากาศจะเกิดสีฟ้าอ่อนๆ (bluish iridescence) (Kleespies *et al*., 1999) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานว่าพบ CrIV

การศึกษาครั้งนี้เป็นการรายงานการตรวจพบโรคติดเชื้อ CrIV ครั้งแรกของประเทศไทย ซึ่งได้จากฟาร์มเลี้ยงจิ้งหรีดในจังหวัดลำพูน ผลการชันสูตรจากประวัติ อาการ และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการบ่งชี้ว่าเกิดจากการติดเชื้อ CrIV ขั้นรุนแรง แนวทางในการชันสูตรที่ได้รายงานในบทความนี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ตรวจและวินิจฉัยโรคติดเชื้อ CrIV ได้

## อุปกรณ์และวิธีการ

**ตัวอย่าง**

จิ้งหรีดป่วยตายถูกส่งมาที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) เมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2551 จากสำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัย (สสอ.) ที่ 5 จังหวัดเชียงใหม่ กรมปศุสัตว์ ซึ่งเป็นของเกษตรกรที่ทำฟาร์มจิ้งหรีดในพื้นที่ ต.ประตูป่า อ.เมือง จ.ลำพูน จิ้งหรีดที่เลี้ยงไว้เริ่มแสดงอาการป่วยเมื่ออายุประมาณ 30-40 วัน มีอาการกินอาหารลดลง ไม่ค่อยเคลื่อนไหว รูปร่างแคระแกร็น มีอัตราการป่วยประมาณ 100% และอัตราการตายประมาณ 30-40% ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด เกษตรกรที่ประกอบอาชีพทำฟาร์มจิ้งหรีดในบริเวณใกล้เคียงมีจำนวนประมาณ 30 ราย และมีจิ้งหรีดที่แสดงอาการป่วยแบบเดียวกันจำนวนหลายฟาร์ม

**การตรวจทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา**

ตัวอย่างจิ้งหรีดได้รับการตรวจซากและผ่าช่องท้องเพื่อหารอยโรค นอกจากนั้นซากจิ้งหรีดที่แช่เย็นขณะขนส่งและอยู่ในสภาพดีจำนวนประมาณ 10 ตัวถูกแช่ถนอมในสารละลายฟอร์มาลีน (10% neutral buffered formalin) นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถูกทำให้แข็งตัวด้วยพาราฟิน (paraffin) เพื่อทำการตัดแผ่นชิ้นเนื้อเยื่อ (ความหนาประมาณ 4 µm) โดยตัดลงบนแผ่นสไลด์แก้วและย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีการทั่วไปทางจุลพยาธิวิทยา สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง (Sheehan and Hrapchak, 1980)

นอกจากนี้แผ่นชิ้นเนื้อเยื่อซึ่งติดอยู่บนสไลด์แก้วจากแท่งพาราฟินที่ถูกย้อมด้วยสี H&E และได้รับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้ว ยังถูกย้อมด้วยสี Feulgen stain เพื่อตรวจหา DNA ในเซลล์ (Wikipedia, 2008) โดยดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ จากนั้นล้างแผ่นสไลด์ด้วย 1 M hydrochloric acid (HCl) ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที หลังจากนั้นแช่แผ่นสไลด์ใน 1M HCl ที่ 60°C นาน 8 นาที จากนั้นจึงล้างด้วย 1M HCl ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที จากนั้นจุ่มแผ่นสไลด์ลงใน Schiff reagent (Merck®) นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างในสารละลาย bisulphite (Merck®) 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที จากนั้นจึงล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 3 นาที แล้วย้อม counter stain ด้วย 1% light green ใน 1% acetic acid นาน 40 วินาที จากนั้นจึงดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วย ethanol แล้วแช่ใน xylene แล้วจึงผนึกสไลด์ด้วย Permount (Fisher Scientific®) เพื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

**การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscopy)**

ตัวอย่างชันสูตรที่แช่อยู่ในฟอร์มาลินถูกนำมาผ่านกระบวนการเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน โดยวิธีการคร่าวๆ ดังนี้ ตัวอย่างถูกตัดให้มีความหนาประมาณ 1 ลบ.มม. และ fix ด้วย osmium tetroxide ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และดึงน้ำออกโดยใช้ ethanol ที่ความเข้มข้น 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% ตามลำดับ จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการ infiltration โดยใช้

1) สารผสมระหว่าง absolute alcohol และ propylene oxide (อัตราส่วน 1:1) 2) propylene oxide 3) สารผสมระหว่าง propylene oxide และ epoxy resin (อัตราส่วน 1:1) และ 4) epoxy resin ตามลำดับ หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ได้นี้มาฝังใน epoxy resin ที่ 60°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง และตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 500°A แล้ววางแผ่นเนื้อเยื่อลงบน grid หลังจากนั้นจึงย้อมด้วย 5% uranyl acetate และ lead citrate แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน JEOL JEM-1200EX (Yan *et al*., 2000)

**การตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)**

นำเนื้อเยื่อส่วนช่องท้องของจิ้งหรีดมาสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience®) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นใช้ primers MCP-F1 (5'-GGT TTC ATC GAT ATC GCC AC-3') และ MCP-R4 (5'-GAA AAG TAA TCA CTG CCC AT-3') (Jakob *et al*., 2002) เพื่อเพิ่มจำนวน Major Capsid Protein (MCP) gene ของ CrIV โดยใช้เครื่อง MyCycler (Bio-Rad®) สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ที่สกัดจากตัวอย่างชันสูตรจิ้งหรีดป่วยตาย 1 µl, 2x *Taq* PCR Master Mix (Qiagen®) 12.5 µl, primers MCP-F1 และ MCP-R4 อย่างละ 400 nM และเติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase 7.5 µl เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 25 µl โดยใช้ PCR profile ดังนี้ 94°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำ pre-denaturation ตามด้วย 35 รอบของ 94°C 30 วินาที 55°C 30 วินาที และ 72°C 2 นาที เพื่อเพิ่มจำนวน DNA จากนั้นทำ final extension ที่ 72°C นาน 7 นาที PCR product ที่ได้นำไปแยกขนาด DNA ด้วยเครื่อง electrophoresis ชนิดแนวนอน โดยใช้ 1.5% agarose gel แล้วจึงแช่ agarose gel ในสารละลาย ethidium bromide (0.3 ng/l) นาน 15 นาที จากนั้นจึงนำไปอ่านและบันทึกผลบนเครื่อง UV transillumilator

**การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)**

นำ PCR product ที่ได้มาล้างด้วยชุดสกัด NucleoSpin Extract II (Macheney-Nagel®) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3130 version 3.1 (Hitachi®) ทั้งสองทิศทางคือ forward และ reverse directions โดยใช้ primers MCP-F1 และ MCP-R4 ตามลำดับ (Tidona and Darai, 1997) หลังจากนั้นนำ sequence ที่ได้มาทำ assembly แล้วจึงนำมาสร้าง alignment โดยใช้โปรแกรม Sci Ed Central software (Scientific and Educational Software®)

## ผล

### การตรวจทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา

พบส่วนหัวของจิ้งหรีดมีขนาดเล็ก ส่วนคอยืดยาวออก ปีกสั้นกว่าปกติ จากการผ่าซาก พบช่องท้องขยายใหญ่ และมีของเหลวสีขาวขุ่นเป็นมันแวววาวอัดแน่นอยู่เต็มช่องท้อง (รูปที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่าของเหลวดังกล่าวจะเกิดสีฟ้าอ่อนๆ เมื่อสัมผัสกับอากาศ และพบว่าซากจิ้งหรีดที่ป่วยตายลอยได้บนผิวน้ำ ในขณะที่ซากจิ้งหรีดที่มีสุขภาพดีจมน้ำ ผลการตรวจทางจุลพยาธิ-วิทยาชิ้นเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสี H&E พบรอยโรคจำเพาะ คือ basophilic intracytoplasmic inclusion body ภายในเซลล์ไขมันในช่องท้อง นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ไขมันมีจำนวน fat vacuoles น้อยลง และจากการนำชิ้นเนื้อเยื่อดังกล่าวมาย้อมด้วยสี Feulgen stain พบว่าไซโตพลาสซึมของเซลล์ไขมันติดสีชมพู (รูปที่ 2)

### การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน

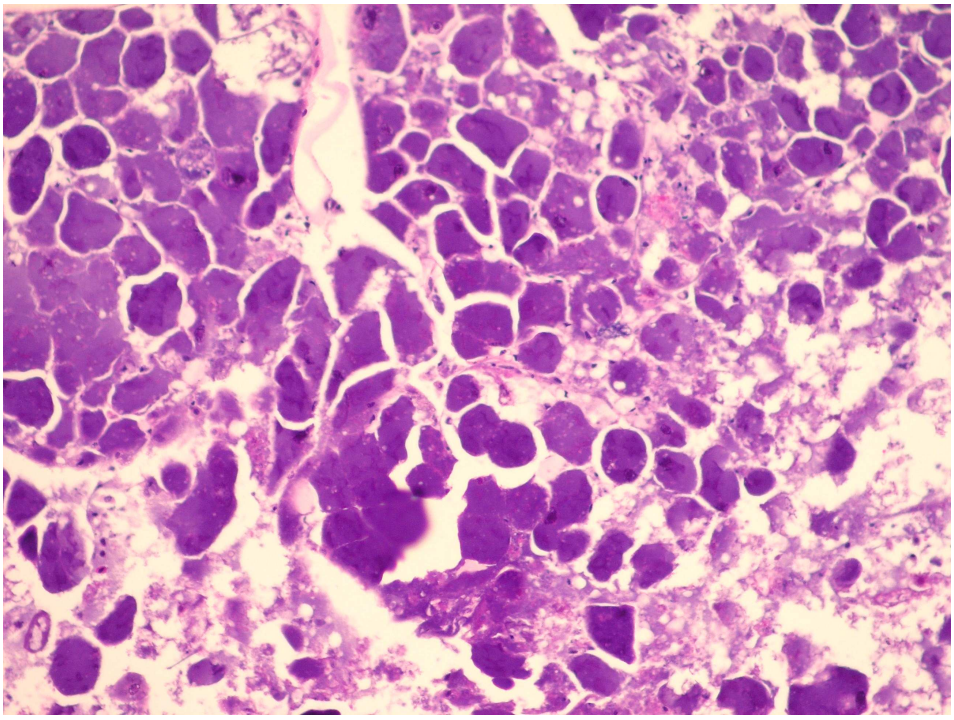
พบ inclusion bodies ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไขมัน (รูปที่ 3) ซึ่งประกอบด้วย virions จำนวนมาก ซึ่งมีรูปร่างแบบ icosahedral ขนาดประมาณ 160 nm นอกจากนี้ยังสามารถแยก virions ได้เป็น 2 ชนิด คือ immature virions ซึ่งมีเฉพาะ capsid และ mature virions ซึ่งมีทั้ง capsid และมี nucleic acid บรรจุอยู่ภายใน นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ไขมันที่ติดเชื้อมีจำนวน fat vacuoles ภายในไซโตพลาสซึมลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไขมันปกติ

### การตรวจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

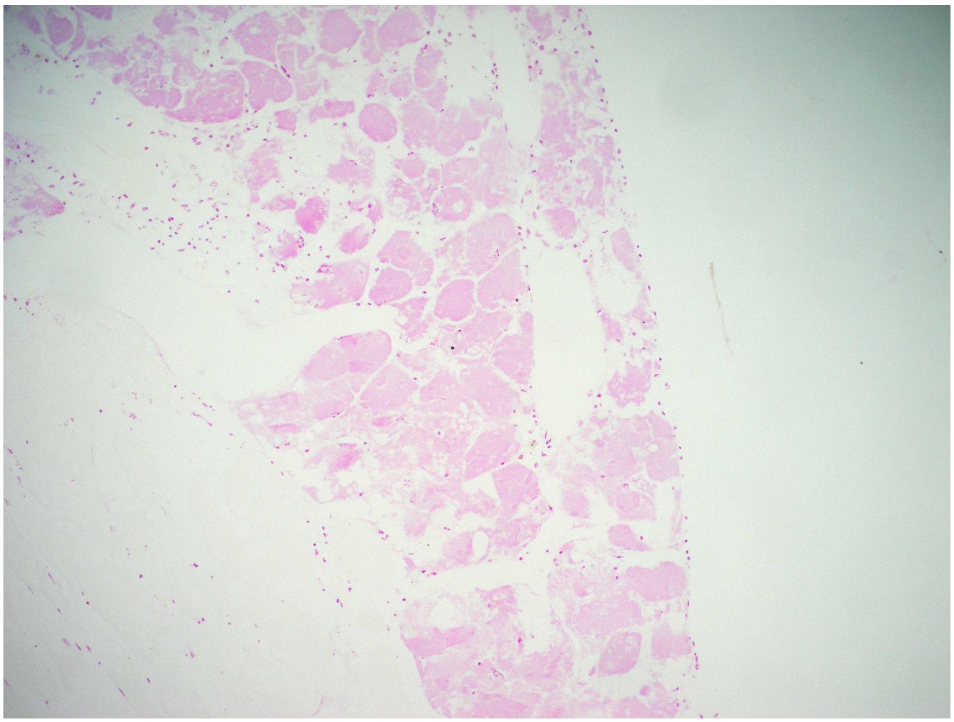
ได้ amplification product ซึ่งความยาวประมาณ 999 bp (รูปที่ 4) และเมื่อนำ amplification product ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำ comparative alignment โดยเปรียบเทียบกับ MCP gene ของ CrIV (Jakob *et al*., 2002) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ทั้งสองมีความคล้ายคลึงกัน 94% (รูปที่ 5)

ก ข

**รูปที่** 1 ตัวอย่างชันสูตรจิ้งหรีดป่วย แสดงรอยโรค ดังนี้ (ก) ช่องท้องขยายใหญ่ และ (ข) ของเหลวสีขาวขุ่นเป็นมันแวววาว อัดอยู่เต็มภายในช่องท้อง และของเหลวดังกล่าวจะเกิดสีฟ้าอ่อนๆ เมื่อสัมผัสกับอากาศ (x10)

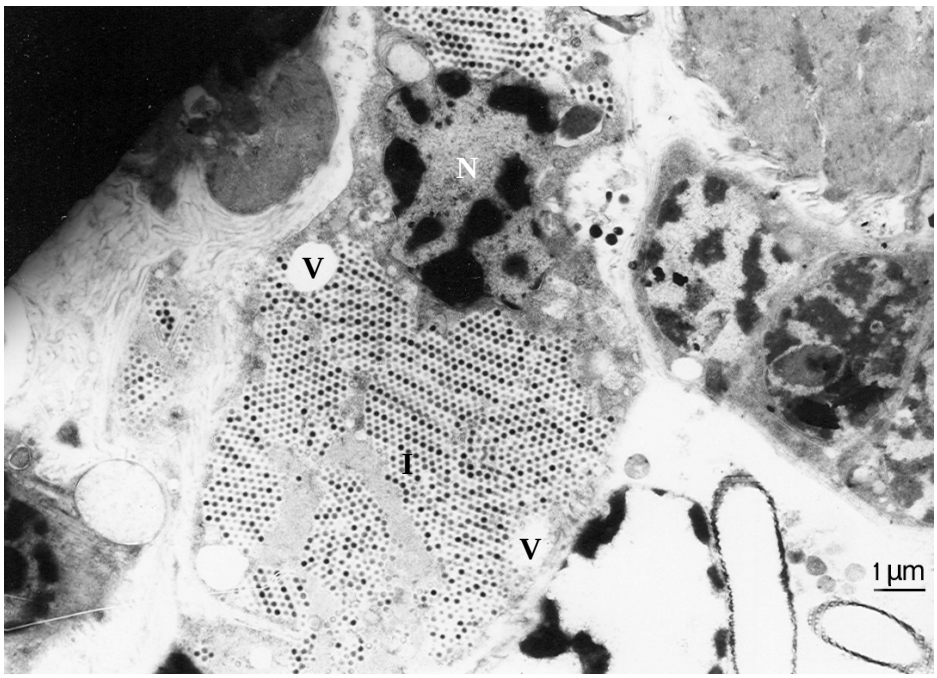


ก

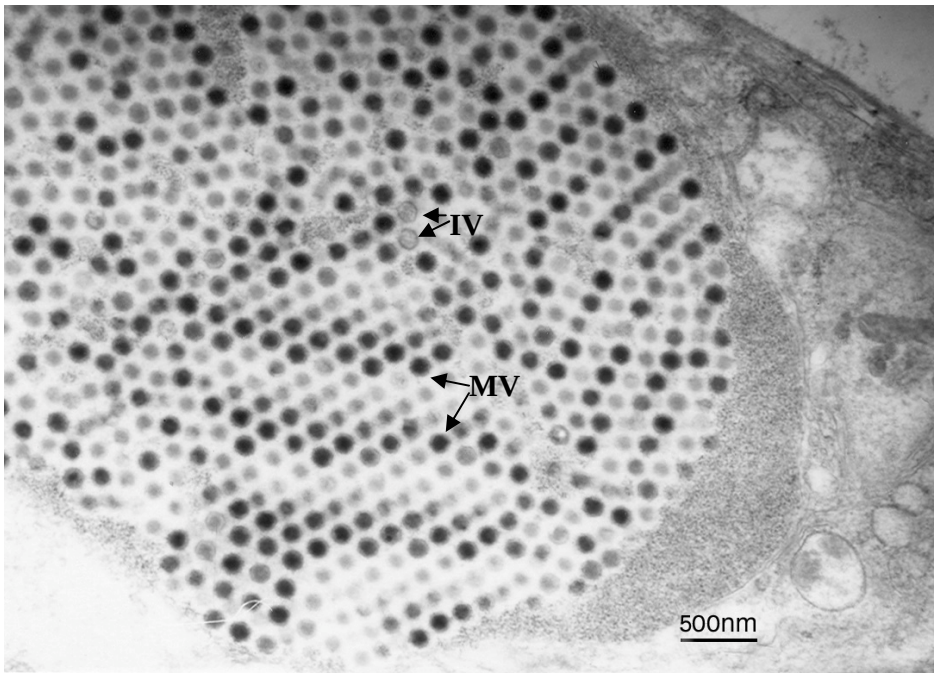


ข

**รูปที่** 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์จากการย้อมชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างชันสูตรจิ้งหรีดป่วยด้วยสีชนิดต่างๆ (ก) แสดง basophilic intracytoplasmic inclusions ในเซลล์ไขมัน (H&E, x200) และ (ข) แสดงการติดสีชมพูภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไขมัน (Feulgen stain, x100)

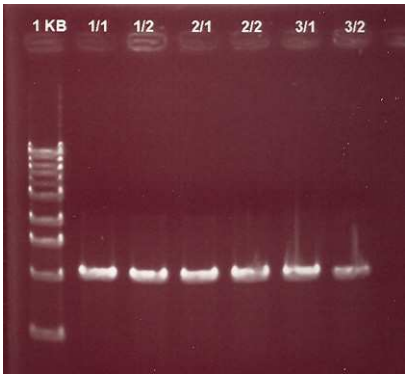



ก




ข

**รูปที่** 3 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน แสดง (ก) inclusion body (I) ซึ่งประกอบด้วย virions จำนวนมากภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไขมัน โดยเซลล์ไขมันมี nucleus (N) และ fat vacuoles (V) จำนวนเล็กน้อย และ (ข) virions ซึ่งมีรูปร่างแบบ icosahedral ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 2 ชนิดคือ immature virions (IV) ซึ่งมีเฉพาะ capsid และ mature virions (MV) ซึ่งมีทั้ง capsid และมี nucleic acid บรรจุอยู่ภายใน




**รูปที่ 4** Polymerase chain reaction ของ Major Capsid Protein (MCP) gene ของ cricket iridovirus (CrIV) จากตัวอย่างชันสูตรจิ้งหรีดป่วยตายจำนวน 3 ตัวอย่าง (แต่ละตัวอย่างได้รับการทดสอบ 2 ครั้ง) โดยใช้ primers MCP-F1 และ MCP-R4 (Jakob *et al*., 2002) แสดง amplification product (999 bp) หลังการทำ electrophoresis บน 1.5% agarose gel ที่แช่ใน ethidium bromide (0.3 ng/l)

```
CrIV              1 atgtatggtggtaaaacatccacagcttattttgtaagagaaactagaaaagcaacatgg
Lampoon           1 ..........---.....................c...................g.......

CrIV             61 tttacccaagtaccggttagtttaactagagcaaacggatcagctaactttggaagcgaa
Lampoon          58 ............................................................

CrIV            121 tggtcggcatccatttctagggccggagattatttgttgtatacttggctaagagtgaga
Lampoon         118 ......................t.......................c.............

CrIV            181 attccatctgtaactttgttagcaacaaatcaatttggtgccaatggtagaattaggtg-
Lampoon         178 .....................a.....................................g

CrIV            240 --tagaaattttatgcataacttaatcagagaatgtagtattacatttaatgatttggta
Lampoon         238 tg.........................................g..............

CrIV            298 gcagcaagatttgatcattatcatctagatttctgggctgcatttacaacacctgcgtcc
Lampoon         298 ........................c.............................a

CrIV            358 aaggcagttggttacgataatatgattggaaatgtttctgctcttattcaaccacaacct
Lampoon         358 ................................a...........................

CrIV            418 gtacctgttgctcctgcaacagtaagtcttcctgaagctgacctgaatttgccattaccc
Lampoon         418 .........ct..................................t..............

CrIV            478 ttcttctt---ttcacgcgattctggagttgctcttcctactgctgctttgccatacaat
Lampoon         478 ........ctt......t.......................................

CrIV            535 gaaatgagaattaatttccaattccatgactggca-cgcttgttgattcttgacaacatt
Lampoon         538 ......c............................a.......................

CrIV            594 gcagccgttgcatcacaaactgttgtacctgttgtag-tgctacaaacgatattgcgacg
Lampoon         598 .....................................g........g.............

CrIV            653 gctcctgttct-catcatggaactgtatggggtaattatgctaatgtctcta-tga-gag
Lampoon         658 ...........t.......................c.......t........a...a...

CrIV            710 cgaagacgtatgggatgctctgtaagagaatatttta---------------actgctcc
Lampoon         718 ............................-......ggttgaacaagttcag........

CrIV            755 gcgtcatgtttggaatccaacaactaatgatgctcctaactacgatattcgcttctctca
Lampoon         777 a.................t..........................................

CrIV            815 tgctattaaagcacttttctttgctgttagaaatacaacctttctaatcaaccttcaaa
Lampoon         837 ..............................t.............................

CrIV            875 ctatacaaccgcttctcctgttattacgtcaacaactgttatttagagccctcaaccgg
Lampoon         897 ............................................................

CrIV            935 ttcttt
Lampoon         957 .g....
```

**รูปที่ 5** Alignment ของ DNA sequence (940 nucleotides) ที่ได้จากตัวอย่างจิ้งหรีดป่วยตายจากจังหวัดลำพูน (Lampoon; DNA เส้นล่าง) เปรียบเทียบกับ Major Capsid Protein (MCP) gene ของ cricket iridovirus (CrIV; DNA เส้นบน) (Jakob *et al*., 2002) แสดง homology ที่ 94% โดย จุด (.) หมายถึง nucleotides จากตัวอย่างชันสูตรที่เหมือนกับ nucleotides ของ CrIV และ ตัวเลขด้านข้าง alignment คือตำแหน่งของ nucleotides

## วิจารณ์และสรุป

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา พบส่วนหัวของจิ้งหรีดมีขนาดเล็ก ส่วนคอยืดยาวออก ปีกสั้นกว่าปกติ เมื่อผ่าตรวจดูภายใน พบช่องท้องขยายใหญ่ และมีของเหลวสีขาวขุ่นเป็นมันแวววาวอัดแน่นอยู่เต็มช่องท้อง ซึ่งอาการป่วยและรอยโรคตรงกับรายงานการศึกษา CrIV ของ Kleespies *et al*. (1999) และ Jakob *et al*. (2002) ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบ basophilic intracytoplasmic inclusion body ภายในเซลล์ไขมัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kleespies *et al*. (1999) และจากการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Feulgen stain ซึ่งใช้สำหรับตรวจหา DNA ภายในเซลล์ พบว่าบริเวณที่เกิด inclusion body นี้ติดสีชมพู แสดงว่า inclusion body นี้มี DNA เป็นส่วนประกอบ หรือกล่าวได้ว่า inclusion body นี้เกิดจาก DNA virus ซึ่งสอดคล้องรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า iridovirus เป็นไวรัสชนิด DNA virus (Delius *et al*., 1984; Schnitzler *et al*., 1987; Soltau *et al*., 1987; Fischer *et al*., 1988a, 1988b; Handermann *et al*., 1992; Stohwasser *et al*., 1993; Sonntag *et al*., 1994a, 1994b; Tidona and Darai, 1997, 2000; Tidona *et al*., 1998; Tinsley *et al*., 1985; Muller *et al*., 1998, 1999; Jakob *et al*., 2001) สำหรับผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน พบว่า inclusion body ประกอบด้วย virions ที่มีรูปร่างแบบ icosahedral และมีขนาดประมาณ 160 nm ซึ่งสอดคล้องกับรูปร่างและขนาดของ CrIV ตามที่ Kleespies *et al*. (1999) รายงานไว้

ผลการทำ PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อ MCP gene ของ CrIV ทำให้ได้ amplification product ที่มีความยาวประมาณ 999 bp ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานของ Jakob *et al*. (2002) แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำ PCR โดยใช้ตัวอย่างควบคุมที่เป็นบวก (positive control) เนื่องจากยังไม่เคยพบการระบาดของ CrIV ในประเทศไทยมาก่อน อย่างไรก็ดีจากการทำ DNA sequencing พบว่า amplification product ที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ MCP gene ของ CrIV กล่าวคือมีความคล้ายคลึงกันมากถึง 94%

ผลการชันสูตรจิ้งหรีดจากประวัติ อาการ และผลทางห้องปฏิบัติการ บ่งชี้ว่าสาเหตุของโรคเกิดจากการติดเชื้อ CrIV ขั้นรุนแรง ซึ่งโรคนี้ไม่มีวิธีรักษาเฉพาะ แต่อาจควบคุมและป้องกันโรคได้ดังนี้ (1) ทำลายจิ้งหรีดที่เป็นโรค โดยวิธีการฝังใต้ระดับผิวดินไม่ต่ำกว่า 20 ซม. ป้องกันสัตว์อื่นมาขุดคุ้ย แล้วราดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรค หรือปูนขาว หรือเผาทำลายซาก รวมทั้งอุปกรณ์ที่มีการปนเปื้อน เช่น ถาดไข่ที่ทำจากกระดาษ ที่ใช้เป็นที่อยู่ของจิ้งหรีดในวงปูน (2) ทำการล้างทำความสะอาด และฆ่าเชื้อโรคด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรค กับอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงจิ้งหรีด เช่น วงปูน อุปกรณ์การให้อาหาร และน้ำ ที่วางไข่ มุ้งเขียว หลังคา ผนัง พื้นทางเดิน และบริเวณรอบโรงเรือน โรงเก็บอาหาร และพักโรงเรือนอย่างน้อย 14-36 วันก่อนนำจิ้งหรีดชุดใหม่เข้ามาเลี้ยง (3) ปรับปรุงรูปแบบการสุขาภิบาล การควบคุมป้องกันโรคภายในฟาร์ม ให้ทำรั้วรอบฟาร์ม ปิดประตูฟาร์ม ไม่ให้บุคคลภายนอกเข้าฟาร์ม มีมาตรการป้องกัน กำจัดสัตว์ที่อาจเป็นพาหะของโรค เช่น นก หนู แมลงสาบ หรือสัตว์ที่มักจะเข้ามาจับจิ้งหรีดในฟาร์มเป็นอาหาร เช่น นก กิ้งก่า คางคก ซึ่งอาจเป็น

แหล่งรังโรคได้ (4) ปรับปรุงรูปแบบการเลี้ยง เช่นมีการแยกจิ้งหรีดตามช่วงอายุ มีการแบ่งแยกสัดส่วนพื้นที่การเลี้ยงในโรงเรือนเป็นส่วนๆ หรือใช้ระบบเข้า-ออกพร้อมกัน (all in-all out) ในการเลี้ยงเพื่อป้องกันหรือลดการแพร่กระจายของโรคภายในฟาร์ม (5) คัดเลือกจิ้งหรีดที่จะนำมาทำพันธุ์ ต้องมาจากฟาร์มที่ปลอดโรค หรือทำการคัดเลือกสายพันธุ์จิ้งหรีดที่มีความต้านทานต่อโรคมาเลี้ยงในฟาร์ม (6) ควรเปลี่ยนสายพันธุ์จิ้งหรีดที่ใช้ทำพ่อแม่พันธุ์ในทุกๆ 10 รุ่น เพื่อป้องกันการเกิดสายเลือดชิดซึ่งจะทำให้จิ้งหรีดไม่อ่อนแอ และไม่ติดเชื้อโรคได้ง่าย (ข้อมูลจาก สสอ. ที่ 5 และ สสช.)

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิงวันทนีย์ เนรมิตมานสุข กลุ่มแบคทีเรีย สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (สสช.) ที่ได้ให้คำแนะนำในการวิจัย ขอบคุณสัตวแพทย์หญิงลัดดา ตรงวงศา และคุณสมจิตร รุจิขวัญ กลุ่มพยาธิวิทยา สสช. ซึ่งช่วยเหลือในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ขอบคุณคุณทริกา จันทมณีโชติ กลุ่มพยาธิวิทยา สสช. ซึ่งช่วยย้อมสไลด์ด้วย Feulgen stain และขอบคุณคุณสุพรรษา สรวลสันต์ คุณชัยวัฒน์ ชัยถาวร ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์น้ำ สสช. ซึ่งช่วยเหลือในการทำพีซีอาร์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

## เอกสารอ้างอิง

Anthony, D.W. and Comps, M. 1991. Iridoviridae. In: Atlas of Invertebrate Viruses. Edited by J .R. Adams and J.R. Bonami. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. p. 55–86.

Bahr, U., Tidona, C.A. and Darai, G. 1997. The DNA sequence of Chilo iridescent virus between the genome coordinated 0.101 and 0.391: similarities in coding strategy between insect and vertebrate iridoviruses. Virus Genes. 17: 59–66.

Boucias, D.G., Maruniak, J.E. and Pendland, J.C. 1987. Characterization of an iridovirus from the southern mole cricket, *Scapteriscus vicinus*. J. Invertebr. Pathol. 50: 238–245.

Carter, J.B. 1973a. The mode of transmission of *Tipula* iridescent virus. I. Source of infection. J. Invertebr. Pathol. 21: 123–130.

Carter, J.B. 1973b. The mode of transmission of *Tipula* iridescent virus. II. Route of infection. J. Invertebr. Pathol. 21: 136–143.

Carter, J.B. 1974. *Tipula* iridescent virus infection in the developmental stages of *Tipula oleracea*. J. Invertebr. Pathol. 24: 271–281.

Cerutti, M. and Devauchelle, G. 1980. Inhibition of macromolecular synthesis in cells infected with an invertebrate virus (iridovirus type 6 or CIV). Arch. Virol. 52: 297–303.

Cerutti, M. and Devauchelle, G. 1982. Isolation and reconstitution of Chilo iridescent virus membrane. Arch. Virol. 74: 145–155.

Cerutti, M. and Devauchelle, G. 1985. Characterization and localization of IIV-6 polypeptides. Virology. 145: 123–131.

Delius, H., Darai, G. and Flugel, R. M. 1984. DNA analysis of insect iridescent virus 6: evidence for circular permutation and terminal redundancy. J. Virol. 49: 609–614.

Fischer, M., Schnitzler, P., Delius, H. and Darai, G. 1988a. Identification and characterization of the repetitive DNA element in the genome of insect iridescent virus type 6. Virology. 167: 485–496.

Fischer, M., Schnitzler, P., Scholz, J., Rosen-Wolff, A., Delius, H. and Darai, G. 1988b. DNA nucleotide sequence analysis of the *Pvu*II DNA Fragment L of the genome of insect iridescent virus type 6 reveals a complex cluster of multiple tandem, overlapping, and interdigitated repetitive DNA elements. Virology. 167: 497–506.

Fukaya, M. and Nasu, S. 1966. A Chilo iridescent virus (IIV-6) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). Applied Entomology Zoology. 1: 69–72.

Fukuda, T. 1971. Per os transmission of Chilo iridescent virus to mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 18: 152–153.

Handermann, M., Schnitzler, P., Rosen-Wolff, A., Raab, K., Sonntag, K.C. and Darai, G. 1992. Identification and mapping of origins of DNA replication within the DNA sequences of the genome of insect iridescent virus type 6. Virus Genes. 6: 19–32.

ICTV. 2002. Iridoviridae. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.036.htm.

Jakob, N.J., Kleespies, R.G., Tidona, C.A., Muller, K., Gelderblom, H.R. and Darai, G. 2002. Comparative analysis of the genome and host range characteristics of two insect iridoviruses: Chilo iridescent virus and a cricket iridovirus isolate. J. Gen. Virol. 83: 463–470.

Jakob, N.J., Muller, K., Bahr, U. and Darai, G. 2001. Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of Chilo iridescent virus. Virology. 286: 182–196.

Just, F.T. and Essbauer, S.S. 2001. Characterization of an iridescent virus isolated from *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae). J. Invertebr. Pathol. 77: 51–61.

Kleespies, R.G., Tidona, C.A. and Darai, G. 1999. Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range. J. Invertebr. Pathol. 73: 84–90.

Muller, K., Tidona, C.A., Bahr, U. and Darai, G. 1998. Identification of a thymidylate synthase gene within the genome of Chilo iridescent virus. Virus Genes. 17: 243–258.

Muller, K., Tidona, C.A. and Darai, G. 1999. Identification of a gene cluster within the genome of Chilo iridescent virus encoding enzymes involved in viral DNA replication and processing. Virus Genes. 18: 243–264.

Schnitzler, P., Soltau, J.B., Fischer, M., Reisner, H., Scholz, J., Delius, H. and Darai, G. 1987. Molecular cloning and physical mapping of the genome of insect iridescent virus type 6: further evidence for circular permutation of the viral genome. Virology. 160: 66–74.

Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B. 1980. Theory and practice of histotechnology. 2nd ed. The C.V. Musby company. St. Louis, Missouri, USA. p. 144.

Soltau, J.B., Fischer, M., Schnitzler, P., Scholz, J. and Darai, G. 1987. Characterization of the genome of insect iridescent virus type 6 by physical mapping. J. Gen. Virol. 68: 2717–2722.

Sonntag, K.C., Schnitzler, P., Janssen, W., and Darai, G. 1994a. Identification of the primary structure and the coding capacity of the genome of insect iridescent virus type 6 between the genome coordinates 0.310 and 0.347 (7990 bp). Intervirology. 37: 287–297.

Sonntag, K.C., Schnitzler, P., Koonin, E., and Darai, G. 1994b. Chilo iridescent virus encodes a putative helicase belonging to a distinct family within the 'DEAD/H' superfamily: implications for the evolution of large DNA viruses. Virus Genes. 8: 151–158.

Stohwasser, R., Raab, K., Schnitzler, P., Janssen, W. and Darai, G. 1993. Identification of the gene encoding the major capsid protein of insect iridescent virus type 6 by polymerase chain reaction. J. Gen. Virol. 74: 873–879.

Tidona, C.A. and Darai, G. 1997. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. Virology. 230: 207–216.

Tidona, C.A. and Darai, G. 2000. Iridovirus homologues of cellular genes: implications for the molecular evolution of large DNA viruses. Virus Genes. 21: 77–81.

Tidona, C.A., Schnitzler, P., Kehm, R. and Darai, G. 1998. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? Virus Genes. 16: 59–66.

Tinsley, T.W. and Kelly, D.C. 1985. Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. In: Viral Insecticides for Biological Control. Edited by K. Maramorosch and K.E. Sherman. London: Academic Press. p. 3–25.

Wikipedia. 2008. “Feulgen stain. Wikepedia, the free encyclopedia.” Wikipedia Foundation, USA. [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Feulgen_stain.

Yan, X., Olson, N.H., Van Etten, J.L., Bergoin, M., Rossmann, M.G. and Baker, T.S. 2000. Structure and assembly of large lipid-containing dsDNA viruses. Nature Struct. Mol. Biol. 7: 101–103.

# Detection and diagnosis of cricket iridovirus infection

**Thinnarat Srisuvan* Tuangthong Patchimasiri Nopporn Tohmee Montakan Vongpakorn**

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, 50 Pahonyothin Road, Kasetklang Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author Tel.: (66) 2579-8908 to 14, Fax: (66) 2579-8918 to 19, E-mail: thinnarats@dld.go.th

## Abstract

This study is aimed at reporting the procedures and techniques used for detection and diagnosis of cricket iridovirus (CrIV) infection. The samples used were collected from cricket farms in Lampoon province. These crickets exhibited clinical signs such as reduced feed consumption and motility, and the morbidity and mortality of the affected crickets were approximately at 100% and 30-40%, respectively. Gross pathological examination showed characteristic distended abdomen, which contained a large amount of whitish opaque fluid that appeared bluish iridescent once exposed to air. The histopathological lesion indicative of CrIV infection as previously reported was basophilic intracytoplasmic inclusion bodies. The results from transmission electron microscopic analysis revealed that these inclusion bodies consisted of a large number of virions. Furthermore, polymerase chain reaction and DNA sequencing of the Major Capsid Protein (MCP) gene revealed that the nucleotide sequence from the studied cricket shared 94% homology with that of CrIV. Thus, it can be concluded from the history, clinical signs, and laboratory examinations that these farmed crickets were severely infected with CrIV. This is the first report of CrIV infection in Thailand.

**Keywords** : cricket, iridovirus, CrIV