

PCR สำหรับทดสอบเชื้อก่อโรคที่สำคัญในกุ้งทะเล 9 ชนิด

ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ* ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ สุพรรณษา ทางดี

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

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

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรายงานวิธีทดสอบโรคติดเชื้อในกุ้งทะเล 9 โรคด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ได้แก่ โรคดวงขาวหรือโรค white spot syndrome virus (WSSV) โรคทอราหรือโรค Taura syndrome virus (TSV) โรคหัวเหลืองหรือโรค yellow head virus (YHV) โรค infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) โรค hepatopancreatic parvovirus (HPV) โรค baculovirus penaei (BP) โรค monodon baculovirus (MBV) โรคกล้ามเนื้อตายหรือโรค infectious myonecrosis virus (IMNV) และโรค necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) ผลการทดสอบความจำเพาะด้วย primers จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิดพบว่า PCR สามารถเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกได้โดยให้ PCR products ที่มีขนาดแตกต่างกัน ผลการทดสอบความไวพบว่าเทคนิค PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวสูงกว่าที่ใช้กันทั่วไป ผลการทดสอบตัวอย่างกุ้งจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีในปี 2552 ด้วยวิธี PCR พบติดเชื้อ WSSV 5 ตัวอย่างจาก 65 ตัวอย่าง (คิดเป็น 7.69%) และไม่พบการติดเชื้อชนิดอื่น วิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีความจำเพาะและความไวสูง สามารถใช้เป็นวิธีทดสอบโรคในกุ้งทะเลและมีประโยชน์ในการวางแผนเฝ้าระวังและควบคุมโรค

คำสำคัญ กุ้งทะเล, WSSV, IHHNV, HPV, BP, MBV, TSV, YHV, IMNV, NHPB

บทนำ

ปัญหาการเกิดโรคระบาดในฟาร์มเลี้ยงกุ้ง นับเป็นปัญหาที่สำคัญประการหนึ่งของการเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย โรคในกุ้งทะเลมีหลายโรค อาทิ โรคดวงขาวหรือโรค white spot syndrome virus (WSSV) โรคทอราหรือโรค Taura syndrome virus (TSV) โรคหัวเหลืองหรือโรค yellow head virus (YHV) โรค infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) โรค hepatopancreatic parvovirus (HPV) โรค baculovirus penaei (BP) โรค monodon baculovirus (MBV) โรคกล้ามเนื้อตายหรือโรค infectious myonecrosis virus (IMNV) และโรค necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) โรคที่กล่าวมานี้ อยู่ในบัญชีโรคระบาดสัตว์ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (OIE, 2009a) เพราะสามารถก่อความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมกุ้ง และเป็นอุปสรรคต่อการค้าและการขนส่งกุ้งระหว่างประเทศ นอกจากนี้โรคติดเชื้อ WSSV, TSV, YHV, IHHNV, HPV, BP และ MBV ยังเป็นโรคระบาดในพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2547 ด้วย

YHV และ TSV เป็นไวรัสที่มี RNA สายเดี่ยว (single-stranded RNA) ก่อโรครุนแรงเฉียบพลันในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ตามลำดับ (Tang and Lightner, 1999; Nunan *et al.*, 1998) WSSV เป็นไวรัสที่มี DNA สายคู่ (double-stranded DNA) ก่อโรคระบาดรุนแรงในกุ้งทะเลหลายสปีชีส์ อัตราการตายอาจสูงถึง 100% ภายใน 3 ถึง 7 วันหลังติดเชื้อ (Lo *et al.*, 1997) HPV และ IHHNV เป็นไวรัสที่มี DNA สายเดี่ยว (single-stranded DNA) (Pantoja and Lightner, 2000; Bonami *et al.*, 1990) ในขณะที่ MBV และ BP เป็นไวรัสที่มี DNA สายคู่ (double-stranded DNA) (Surachetpong *et al.*, 2005; Bonami *et al.*, 1995) ไวรัสทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นสาเหตุทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้า แคระแกร็น และทำให้ผลผลิตกุ้งทะเลตกต่ำ (Lightner, 1996) IMNV เป็นไวรัสที่มี RNA สายคู่ (double-stranded RNA) เป็นสาเหตุของโรคกล้ามเนื้อตายในกุ้งขาวแวนนาไม (Poulos *et al.*, 2006) NHPB เป็นแบคทีเรียภายในเซลล์ชนิด gram negative ที่คล้ายริกเก็ตเซีย เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร อัตราการตายอยู่ระหว่าง 20% ถึง 95% (Loy *et al.*, 1996) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานว่าพบ BP, IMNV และ NHPB

โรคติดเชื้อในกุ้งทะเลสามารถทดสอบได้ด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการ เช่น วิธีทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา, polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR) และ real-time PCR (OIE, 2009b) เป็นต้น การศึกษาค้นคว้าวิจัยวัตถุประสงค์เพื่อรายงานการพัฒนาวิธีทดสอบด้วยเทคนิค PCR สำหรับเชื้อโรคในกุ้งทะเลทั้ง 9 ชนิด ผลการศึกษาพบว่าเทคนิค PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะและความไวสูง สามารถนำไปใช้ทดสอบการติดเชื้อโรคทั้ง 9 ชนิดจากตัวอย่างกุ้งทะเลได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างกุ้ง

กุ้งที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวน 65 ตัวอย่าง (กุ้ง 5 ตัว/ตัวอย่าง) เป็นกุ้งวานนาไมและกุ้งกุลาดำ 63 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ ได้จากการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างใน จ. สุราษฎร์ธานี เมื่อเดือนพฤศจิกายน 2552 ซึ่งเป็นของเกษตรกรที่ทำฟาร์มกุ้งใน อ.เมือง อ.กาญจนดิษฐ์ อ.ท่าชนะ อ.ไชยา อ.ดอนสัก อ.พุนพิน และ อ.ท่าฉาง กุ้งที่เลี้ยงไว้โดยทั่วไปกินอาหารเป็นปกติ ไม่แสดงอาการป่วยหรือตาย เกษตรกรที่ประกอบอาชีพทำฟาร์มเลี้ยงกุ้งใน จ.สุราษฎร์ธานี มีจำนวนประมาณ 350 ราย สำหรับตัวอย่างควบคุมผลบวก (positive control) ได้แก่ กุ้งที่มีเชื้อ HPV, BP, MBV, IMNV หรือ NHPB ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยอิริโซนา ประเทศสหรัฐอเมริกา และกุ้งที่มีเชื้อ WSSV, TSV, YHV หรือ IHNV ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี สำหรับตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control) ได้แก่ กุ้งที่ไม่มีเชื้อ และน้ำกลั่น

การสกัดกรดนิวคลีอิก

นำเนื้อเยื่อของกุ้งมาสกัดกรดนิวคลีอิกโดยใช้ชุดสกัด MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ โดยแบ่งประเภทของเนื้อเยื่อนำมาสกัดกรดนิวคลีอิกเป็น 2 ประเภทขึ้นกับชนิดของเชื้อที่ทดสอบ ดังนี้ ประเภทแรก ขาวายน้ำ (pleopods) ใช้ในกรณีที่ต้องการสกัดกรดนิวคลีอิกของเชื้อโรคที่แพร่ตามระบบต่างๆ ของร่างกาย (systemic infections) ได้แก่ WSSV, IHNV, TSV, YHV และ IMNV ประเภทที่ 2 hepatopancreas และ midgut ใช้ในกรณีที่ต้องการสกัดกรดนิวคลีอิกของเชื้อโรคทางเดินอาหาร (enteric infections) ได้แก่ HPV, BP, MBV และ NHPB วัดความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer รุ่น ND-1000 และเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อการทดสอบการติดเชื้อต่อไป

การทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธี two-step polymerase chain reaction (two-step PCR)

ทำ two-step PCR (อาจเรียกว่า nested PCR) เพื่อทดสอบการติดเชื้อ WSSV กล่าวคือ ทำ PCR 2 ขั้นตอนโดยใช้ primers จำเพาะจำนวน 2 คู่ (ตารางที่ 1) สารผสมในปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนแรกประกอบด้วย DNA ที่สกัดจากตัวอย่างกุ้ง 3 μl , illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) จำนวน 1 bead (1 bead ประกอบด้วย illustra puReTaq DNA polymerase 2.5 units และ dNTP อย่างละ 200 μM ใน 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2), primers WSE/1 และ WSE/2 อย่างละ 300 nM และเติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase และ DNase เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 25 μl ทำ PCR โดยใช้ PCR profile ดังนี้ 95°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำ initial denaturation ตามด้วย 35

ตารางที่ 1 Primers จำเพาะสำหรับเชื้อโรคที่สำคัญ 9 ชนิดที่พบในกุ้งทะเล

เชื้อ	Primers	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' --> 3')	Amplicons (basepairs)	ที่มา
WSSV	WSE/1	ACT ACT AAC TTC AGC CTA TCT AG	1,447	Lo <i>et al.</i> (1997)
	WSE/2	TAA TGC GGG TGT AAT GTT CTT ACG A		
	WSI/3	GTA ACT GCC CCT TCC ATC TCC A	941	
	WSI/4	TAC GGC AGC TGC TGC ACC TTG A		
IHHNV	389F	CGC AAC ACA ACC CGA CTT TA	389	NCBI (2009b)
	389R	GGC CAA GAC CAA AAT ACG AA		
HPV	HPV2F	GGA AGC CTG TGT TCC TGA CT	595	Pantoja and Lightner (2000)
	HPV2R	CGT CTC CGG ATT GCT CTG AT		
BP	6581F	TGT AGC AGC AGA GAA GAG	644	NCBI (2009a)
	6582R	CAC TAA GCC TAT CTC CAG		
MBV	261F	AAT CCT AGG CGA TCT TAC CA	261	Surachetpong <i>et al.</i> (2005)
	261R	CGT TCG TTG ATG AAC ATC TC		
TSV	9992F	AAG TAG ACA GCC GAG CTT	231	Nunan <i>et al.</i> (1998)
	9195R	TCA ATG AGA GCT TGG TCC		
YHV	273F	CAA GAT CTC ACG GCA ACT CA	273	Tang and Lightner (1999)
	273R	CCG ACG AGA GTG TTA GGA GG		
IMNV	4587F	CGA CGC TGC TAA CCA TAC AA	328	Poulos <i>et al.</i> (2006)
	4914R	ACT CGG CTG TTC GAT CAA GT		
NHPB	NHPF/2	CGT TGG AGG TTC GTC CTT CAG T	379	NCBI (2009c)
	NHPR/2	GCC ATG AGG ACC TGA CAT CAT C		

รอบของ 95°C 30 วินาที 55°C 30 วินาที และ 72°C 1.5 นาที เพื่อเพิ่มจำนวน DNA จากนั้นทำ final extension ที่ 72°C นาน 7 นาที นำ PCR product ที่ได้จาก PCR ขั้นตอนแรกไปแยกขนาด DNA ด้วยเครื่อง electrophoresis ชนิดแนวนอน โดยใช้ 2% agarose gel แล้วจึงแช่ agarose gel ในสารละลาย ethidium bromide (0.3 ng/l) นาน 15 นาที จากนั้นจึงนำไปอ่านและบันทึกผลบนเครื่อง UV transilluminator จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนที่สอง โดยผสมในปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนที่สองประกอบด้วย PCR product ที่ได้จาก PCR ขั้นตอนแรก 3 µl, illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) จำนวน 1 bead, primers WSI/3 และ WSI/4 อย่างละ 300 nM และเติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase และ DNase เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 25 µl โดยใช้ PCR profile เช่นเดียวกับ two-step PCR ขั้นตอนที่สอง นำ PCR product ที่ได้จาก PCR ขั้นตอนที่ 2 ไปแยกขนาด DNA ด้วยวิธี electrophoresis ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

การทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธี one-step polymerase chain reaction (one-step PCR)

ทำ one-step PCR เพื่อทดสอบการติดเชื้อ IHNV, HPV, BP, MBV และ NHPB โดยใช้ primers จำเพาะจำนวน 1 คู่ต่อเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ที่สกัดจากตัวอย่างทั้ง 3 μ l, illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) จำนวน 1 bead, forward และ reverse primers อย่างละ 300 nM และเติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase และ DNase เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 25 μ l ทำ PCR โดยใช้ PCR profile เช่นเดียวกับ two-step PCR ขั้นตอนแรกสำหรับเชื้อ WSSV แล้วนำ PCR product ที่ได้ไปแยกขนาด DNA ด้วยวิธี electrophoresis ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

การทดสอบการติดเชื้อด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ทำ RT-PCR เพื่อทดสอบการติดเชื้อ TSV, YHV และ IMNV โดยใช้ primers จำเพาะจำนวน 1 คู่ต่อเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย RNA ที่สกัดจากตัวอย่างทั้ง 3 μ l, 5x OneStep RT-PCR Buffer (Qiagen) 5 μ l, dNTP อย่างละ 400 μ M, forward และ reverse primers อย่างละ 600 nM, OneStep RT-PCR Enzyme Mix (Qiagen) 1 μ l และเติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase และ DNase เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 25 μ l ทำ RT-PCR โดยใช้ PCR profile ดังนี้ 50°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำ reverse transcription ตามด้วย 95°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำ initial denaturation ตามด้วย 35 รอบของ 95°C 30 วินาที 55°C 30 วินาที และ 72°C 1.5 นาที เพื่อเพิ่มจำนวน DNA จากนั้นทำ final extension ที่ 72°C นาน 7 นาที นำ PCR product ที่ได้ไปแยกขนาด DNA ด้วยวิธี electrophoresis ตามที่ได้กล่าวแล้ว

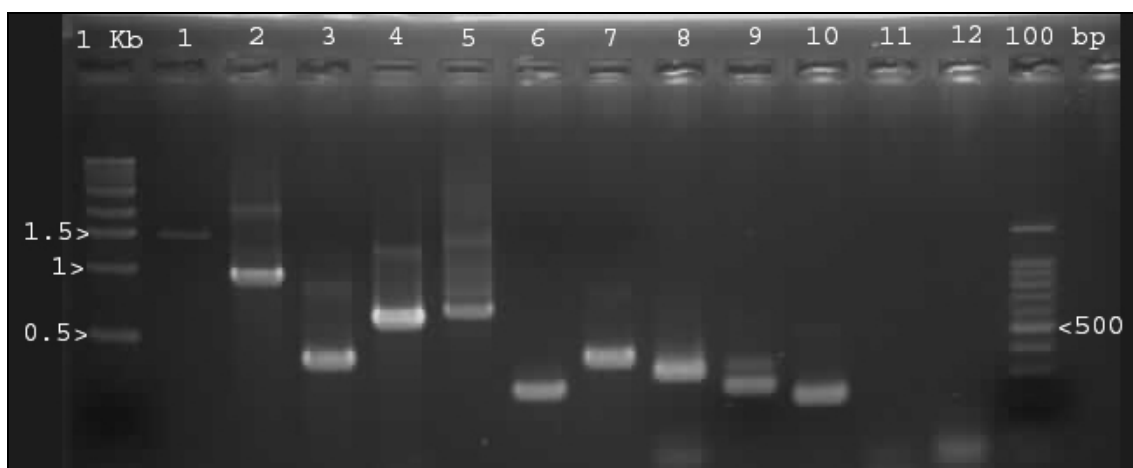
การทดสอบความจำเพาะและความไวของวิธีทดสอบ

ทดสอบความจำเพาะของ PCR โดยใช้ PCR profile ข้างต้นและ primers แต่ละคู่กับกรดนิวคลีอิกของเชื้อทั้ง 9 ชนิด และของตัวอย่างทั้งที่ไม่ติดเชื้อ สำหรับการทดสอบความไวของ PCR ใช้ 10-fold serial dilutions ของกรดนิวคลีอิกของเชื้อแต่ละชนิด (ความเข้มข้น 50 ng ถึง 10^{-7} ag)

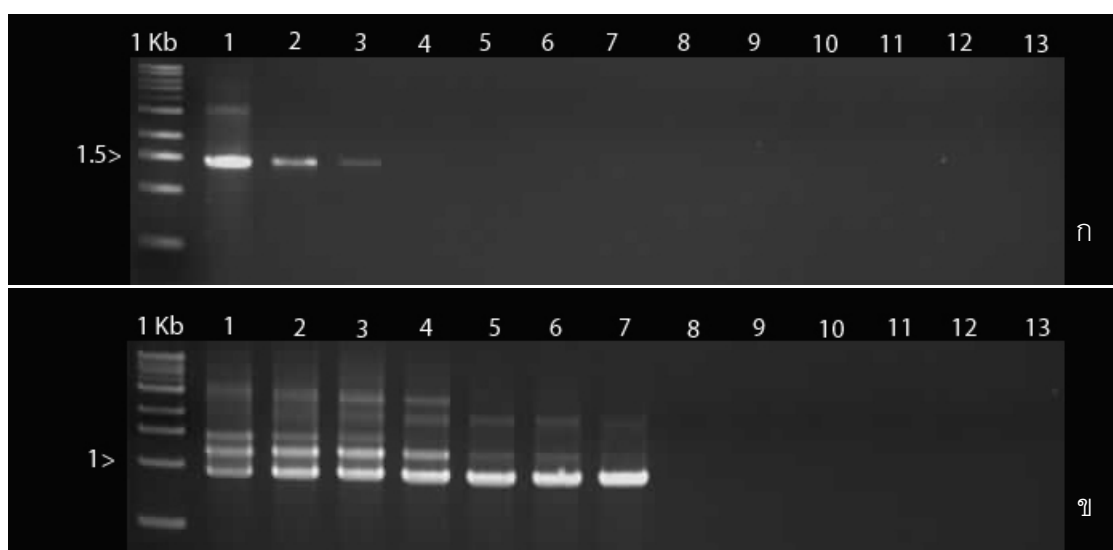
ผล

ความจำเพาะของ PCR

ได้ PCR products ที่มีขนาดแตกต่างกันเมื่อใช้ primers จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด กล่าวคือ PCR products มีความยาวประมาณ 1,447 bp และ 941 bp สำหรับ WSSV (จาก two-step PCR ขั้นตอนแรกและขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับ), 389 bp สำหรับ IHNV, 595 bp สำหรับ HPV, 644 bp สำหรับ BP, 261 bp สำหรับ MBV, 231 bp สำหรับ TSV, 273 bp สำหรับ YHV, 328 bp สำหรับ IMNV และ 379 bp สำหรับ NHPB โดยไม่พบ PCR product จากกรดนิวคลีอิกของเชื้อต่างชนิด น้ำกลั่นและทั้งที่ไม่ติดเชื้อ (รูปที่ 1)



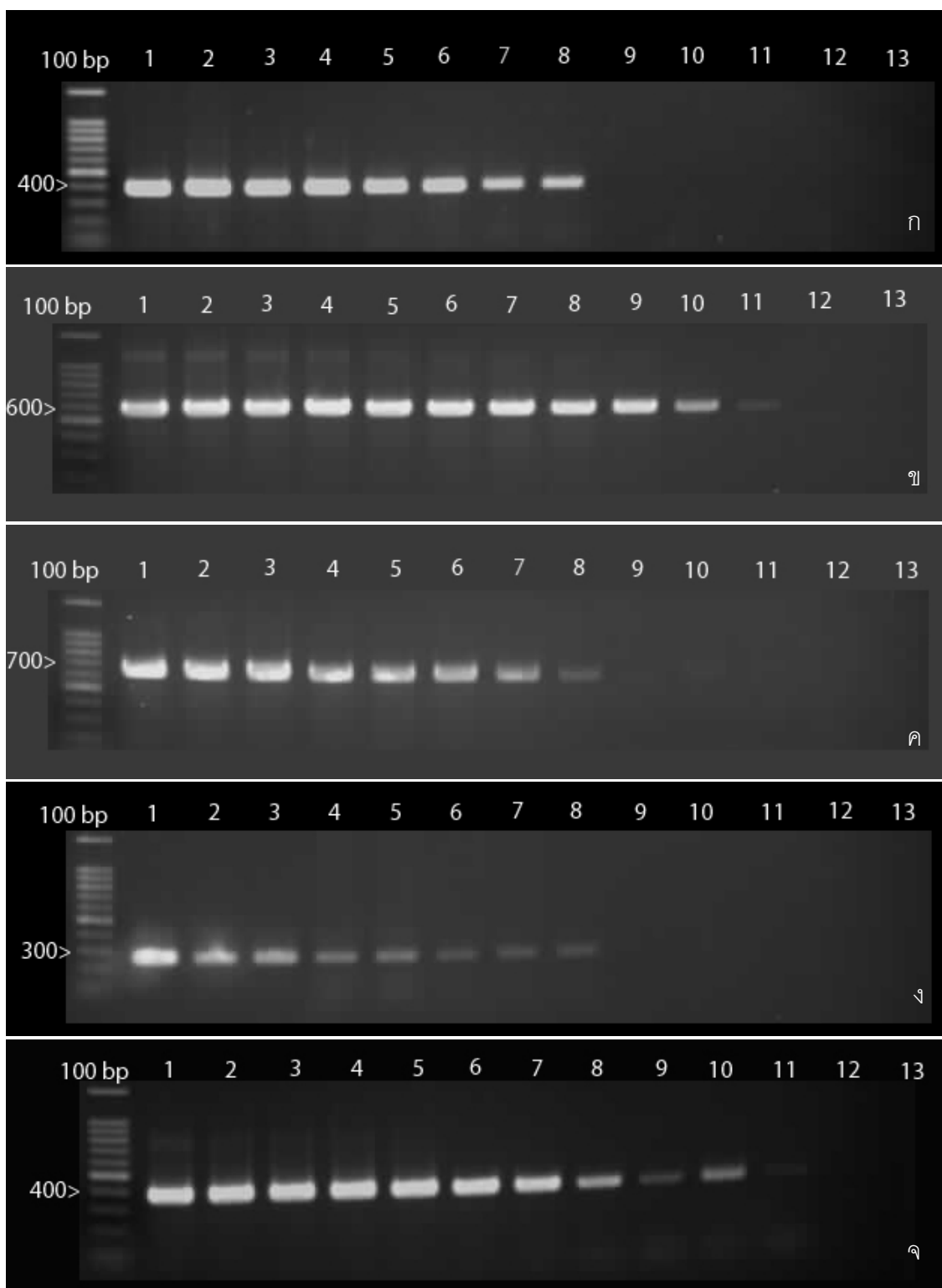
รูปที่ 1 ความจำเพาะของ PCR สำหรับเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกของเชื้อที่สำคัญ 9 ชนิดในกุ้งทะเลโดยใช้ primers จำเพาะ ช่องที่ 1 – 2 แสดง two-step PCR สำหรับ WSSV ขั้นตอนแรก (ช่องที่ 1) และ ขั้นตอนที่ 2 (ช่องที่ 2) ช่องที่ 3 – 7 แสดง PCR สำหรับ IHHNV (ช่องที่ 3) HPV (ช่องที่ 4) BP (ช่องที่ 5) MBV (ช่องที่ 6) และ NHPB (ช่องที่ 7) ช่องที่ 8 – 10 แสดง RT-PCR สำหรับ IMNV (ช่องที่ 8) YHV (ช่องที่ 9) และ TSV (ช่องที่ 10) ช่องที่ 11 คือ น้ำกลั่น ช่องที่ 12 คือ ตัวอย่างกุ้งไม่ติดเชื้อ



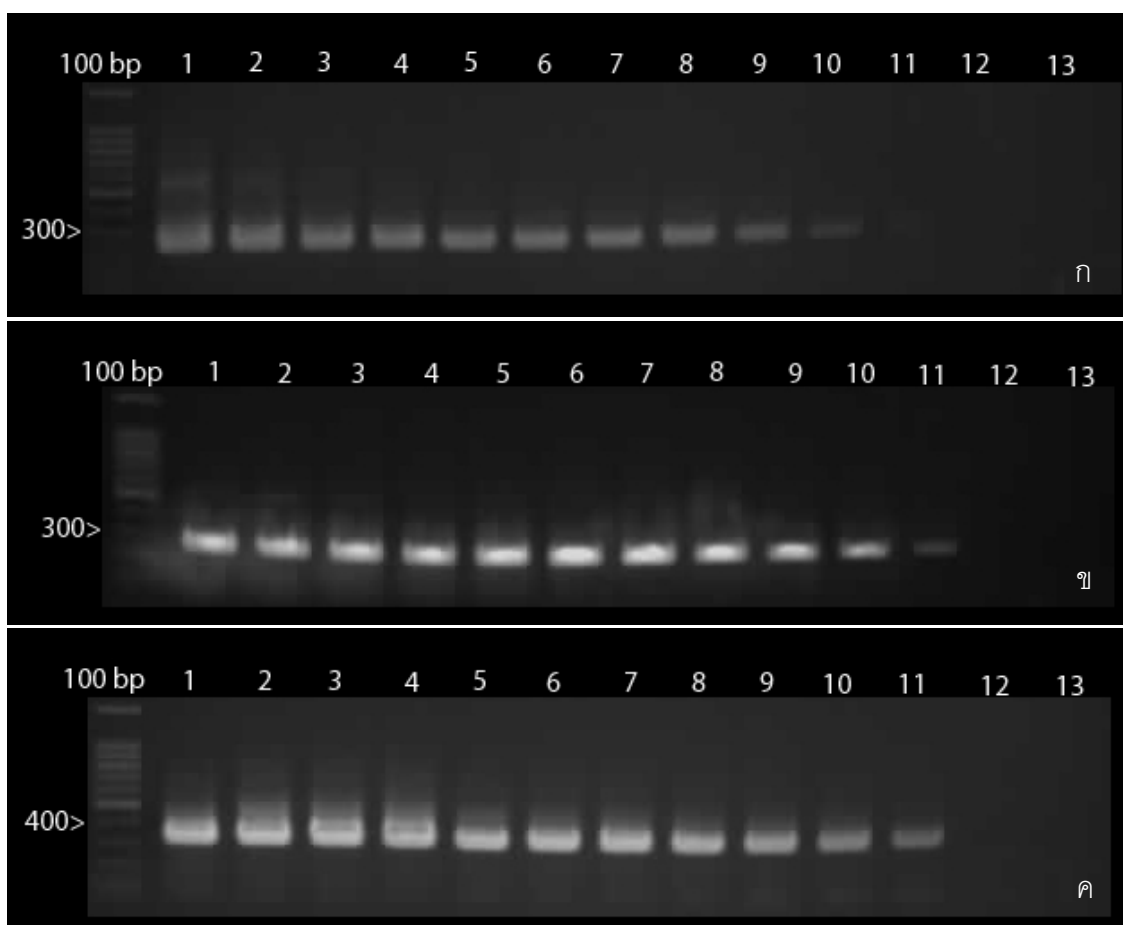
รูปที่ 2 ความไวของ two-step PCR (ก) ขั้นตอนที่ 1 และ (ข) ขั้นตอนที่ 2 โดยใช้ 10-fold serial dilutions ของ WSSV DNA ช่องที่ 1 – 13: 100 fg – 10^{-7} ag

ความไวของ PCR

ใช้ 10-fold serial dilutions ของกรดนิวคลีอิกของเชื้อแต่ละชนิด พบว่า detection limit ของ PCR เท่ากับ 0.0001 fg สำหรับ WSSV, 5 fg สำหรับ IHHNV, 0.015 fg สำหรับ HPV, 5 fg สำหรับ BP, 15 fg สำหรับ MBV, 0.15 fg สำหรับ NHPB, 0.15 fg สำหรับ TSV, 0.015 fg สำหรับ YHV และ 0.03 fg สำหรับ IMNV (รูปที่ 2 ถึง 4)



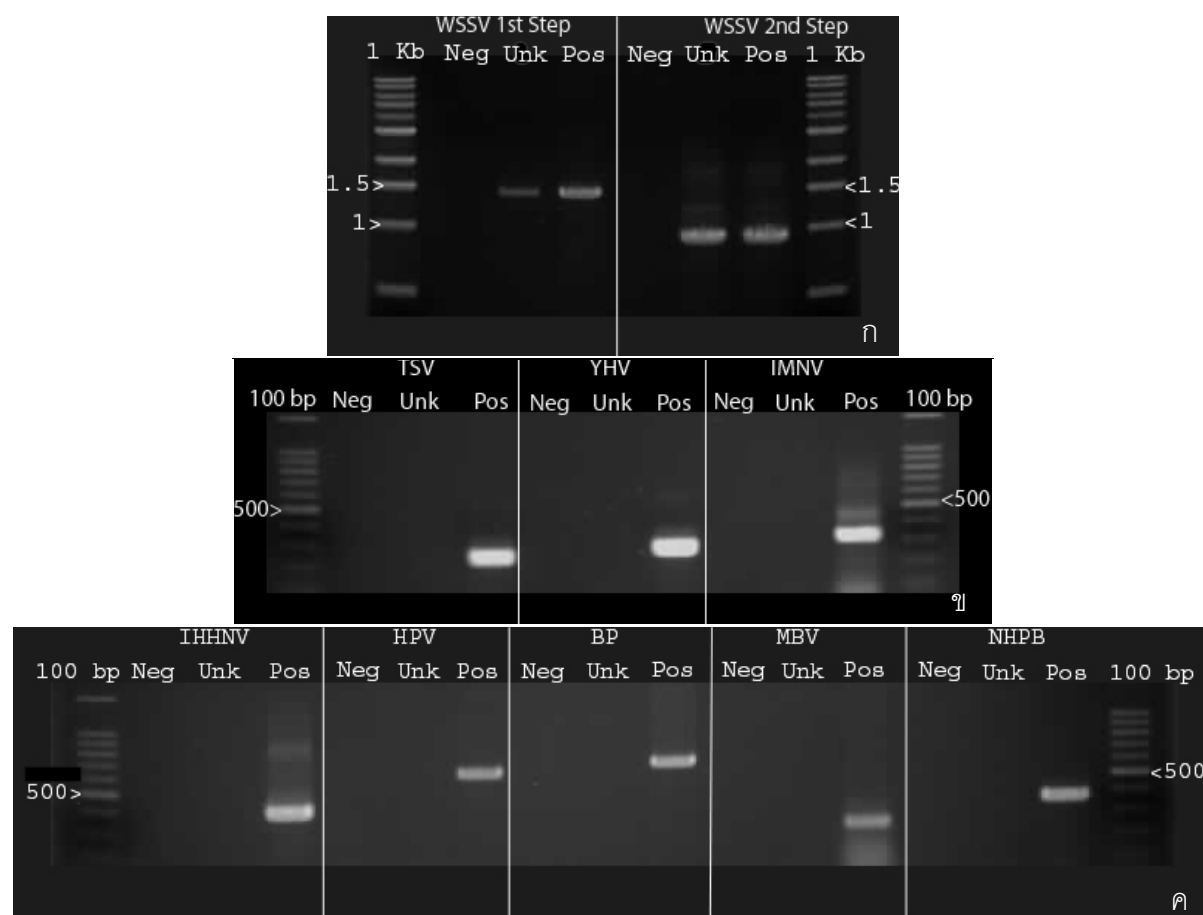
รูปที่ 3 ความไวของ PCR โดยใช้ 10-fold serial dilutions ของ (ก) IHHNV DNA ช่องที่ 1 – 13: 50 ng – 0.05 ag (ข) HPV DNA ช่องที่ 1 – 13: 150 ng – 0.15 ag (ค) BP DNA ช่องที่ 1 – 13: 50 ng – 0.05 ag (ง) MBV DNA ช่องที่ 1 – 13: 150 ng – 0.15 ag และ (จ) NHPB DNA ช่องที่ 1 – 13: 150 ng – 0.15 ag



รูปที่ 4 ความไวของ RT-PCR โดยใช้ 10-fold serial dilutions ของ (ก) TSV RNA ช่องที่ 1 – 13: 150 ng – 0.15 ag (ข) YHV RNA ช่องที่ 1 – 13: 150 ng – 0.15 ag และ (ค) IMNV RNA ช่องที่ 1 – 13: 300 ng – 0.3 ag

การทดสอบการติดเชื้อในตัวอย่างกุ้งด้วยเทคนิค PCR

พบตัวอย่างกุ้งจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีติดเชื้อ WSSV 5 ตัวอย่างจาก 65 ตัวอย่าง (คิดเป็น 7.69%) กุ้งทั้ง 5 ตัวอย่างแสดงผลบวกจาก PCR ทั้งสองขั้นตอน ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นการติดเชื้อ WSSV ขั้นรุนแรง กุ้ง 5 ตัวอย่างนี้มาจาก อ.เมือง อ.ท่าฉาง อ.กาญจนดิษฐ์ อำเภอละ 1 ตัวอย่าง เป็นกุ้งขาววานนาไมทั้ง 3 ตัวอย่าง และมาจาก อ.พุนพิน 2 ตัวอย่าง เป็นกุ้งขาววานนาไมและกุ้งกุลาดำชนิดละ 1 ตัวอย่าง ไม่พบการติดเชื้อ TSV, YHV, IMNV, IHNV, HPV, BP, MBV และ NHPB ในกุ้งทั้ง 65 ตัวอย่าง (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การทดสอบโรคติดเชื้อที่สำคัญ 9 โรคในกุ้งทะเลที่เก็บจาก จ.สุราษฎร์ธานี เมื่อเดือน พ.ย. 2552 ด้วยวิธี PCR แสดง (ก) การติดเชื้อ WSSV (5 ตัวอย่างจาก 65 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.69%) และ (ข และ ค) ไม่พบการติดเชื้อ TSV, YHV, IMNV, IHNV, HPV, BP, MBV และ NHPB โดย Unk หมายถึง ตัวอย่างทดสอบ (unknown sample) Neg หมายถึง ตัวอย่างควบคุมผลลบ (negative control) และ Pos หมายถึง ตัวอย่างควบคุมผลบวก (positive control) (แสดงผลของ 1 ตัวอย่าง)

วิจารณ์และสรุป

ผลการทำ PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด ทำให้ได้ PCR products ที่มีความยาวแตกต่างกัน แสดงว่า PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง สามารถใช้แยกความแตกต่างเชื้อทั้ง 9 ชนิดได้ กล่าวคือ ได้ PCR products ที่มีความยาวประมาณ 1,447 bp และ 941 bp สำหรับ WSSV (จาก two-step PCR ขั้นตอนแรก และ ขั้นตอนที่ 2 ตามลำดับ), 389 bp สำหรับ IHNV, 595 bp สำหรับ HPV, 644 bp สำหรับ BP, 261 bp สำหรับ MBV, 231 bp สำหรับ TSV, 273 bp สำหรับ YHV, 328 bp สำหรับ IMNV และ 379 bp สำหรับ NHPB ซึ่งสอดคล้องกับความยาวของ PCR products จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ (Lo *et al.*, 1997; Bonami *et al.*, 1990; Pantoja and Lightner, 2000; Bonami *et al.*, 1995;

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความไวของ PCR ที่พัฒนาขึ้นกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้

เชื้อ	detection limit ของ PCR ที่พัฒนาขึ้น	detection limit ของ PCR จาก ผลการศึกษาก่อนหน้านี้	เปรียบเทียบกับ ผลการศึกษาก่อนหน้านี้
WSSV	0.0001 fg	100 pg (Xie <i>et al.</i> , 2007)	ไวกว่า (10^9 เท่า)
IHHNV	5 fg	100 pg (Xie <i>et al.</i> , 2007)	ไวกว่า (20,000 เท่า)
HPV	0.015 fg	1 pg (Khawsak <i>et al.</i> , 2008)	ไวกว่า (66,667 เท่า)
BP	5 fg	N/A	—
MBV	15 fg	1.5 pg (Khawsak <i>et al.</i> , 2008)	ไวกว่า (100 เท่า)
NHPB	0.15 fg	N/A	—
TSV	0.15 fg	0.15 pg (Khawsak <i>et al.</i> , 2008)	ไวกว่า (1,000 เท่า)
YHV	0.015 fg	0.1 pg (Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1997)	ไวกว่า (6,667 เท่า)
IMNV	0.03 fg	N/A	—

N/A หมายถึง ไม่มีข้อมูล (data not available)

Surachetpong *et al.*, 2005; Nunan *et al.*, 1998; Tang and Lightner, 1999; Poulos *et al.*, 2006; Loy *et al.*, 1996)

detection limit ของ PCR เท่ากับ 0.0001 fg สำหรับ WSSV, 5 fg สำหรับ IHHNV, 0.015 fg สำหรับ HPV, 5 fg สำหรับ BP, 15 fg สำหรับ MBV, 0.15 fg สำหรับ NHPB, 0.15 fg สำหรับ TSV, 0.015 fg สำหรับ YHV และ 0.03 fg สำหรับ IMNV จากการเปรียบเทียบพบว่า PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่าไวสูงกว่า PCR ที่เคยรายงานไว้ (ตารางที่ 2) ทั้งนี้คาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจาก DNA polymerase ที่ใช้มีประสิทธิภาพสูงกว่าที่ใช้กันทั่วไป สำหรับการทำให้ two-step PCR เพื่อทดสอบการติดเชื้อ WSSV ซึ่งทำ PCR 2 ขั้นตอนทำให้ความไวของการทดสอบเพิ่มขึ้น กล่าวคือ detection limit ของ PCR ขั้นตอนแรกและขั้นตอนที่ 2 เท่ากับ 1 fg และ 0.0001 fg ตามลำดับ (เพิ่มขึ้น 10,000 เท่า) นอกจากนี้การทำ two-step PCR สำหรับทดสอบการติดเชื้อ WSSV ยังใช้จำแนกประเภทหรือความรุนแรงของการติดเชื้อได้ กล่าวคือ หากพบผลบวกของ PCR ทั้งสองขั้นตอน บ่งชี้ว่าเป็นการติดเชื้อขั้นรุนแรง ในขณะที่การพบผลบวกของ PCR จากขั้นตอนที่สองขั้นตอนเดียว บ่งชี้ว่าเป็นการติดเชื้อแบบแอบแฝง (latent infection) (OIE, 2009b)

ผลการทดสอบตัวอย่างกุ้งจาก จ.สุราษฎร์ธานี ซึ่งเก็บตัวอย่างเมื่อเดือน พ.ย. 2552 จำนวน 65 ตัวอย่าง พบติดเชื้อ WSSV 5 ตัวอย่าง (คิดเป็น 7.69%) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบการติดเชื้อ WSSV ค่อนข้างสูงในตัวอย่างกุ้งจากภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย (Khawsak *et al.*, 2008) ทั้งนี้ข้อมูลจากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งสุราษฎร์ธานีระบุว่าพื้นที่จังหวัดสุราษฎร์ธานีได้เกิดโรคหัวเหลืองเมื่อปี 2536–2537 และโรคดวงขาวตั้งแต่ปี 2537 จนถึงปัจจุบัน ผู้ประกอบการฟาร์มเลี้ยงกุ้งได้พยายาม

ติดตามข้อมูลทางวิชาการและปรับพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงและการป้องกันโรคมาโดยตลอด ปัจจุบันใช้วิธี
รณรงค์ให้ฟาร์มเลี้ยงกุ้งจัดทำแผนป้องกันโรคอย่างเต็มรูปแบบ เรียกว่า แผนป้องกันโรคทางชีวภาพ
(biosecurity plan) โดยประยุกต์หลักการ Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) มาใช้
ในระบบฟาร์ม (OIE, 2009a) มีสาระสำคัญ คือ (1) กำหนดวิธีและเขตป้องกันโรค 3 ชั้น คือ ชั้นแรก เขต
ฟาร์ม เป็นเขตห้ามเข้า มีระบบฆ่าเชื้อก่อนเข้าฟาร์ม เช่น การอาบน้ำ การล้างล้อรถยนต์ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ
ชั้นที่สอง เป็นต้น เขตพื้นที่รอบบ่อ มีการป้องกันสัตว์พาหะนำโรค เช่น มีผ้าใบล้อมกันปูและสัตว์เลื้อยคลาน
ซึ่งสายกันนกหรือมีวิธีป้องกันหรือไล่นกที่เหมาะสม เป็นต้น และชั้นที่สาม เขตบ่อเลี้ยง เป็นเขตห้าม
บุคคลภายนอกเข้าเด็ดขาด และจัดคนรับผิดชอบเฉพาะบ่อ (2) กรองและกำจัดสัตว์พาหะนำโรค เช่น เลี้ยง
ปลาหลากหลายในระบบบ่อพักน้ำ เพื่อให้ปลาเก็บกินสัตว์พาหะนำโรค และใช้สารกำจัดสัตว์พาหะนำโรคที่
ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เช่น สารกลุ่มไพริทอยด์ สำหรับบ่อเลี้ยงให้กำจัดสัตว์พาหะนำโรค และกรองน้ำ
อย่างละเอียดด้วยผ้ากรองก่อนนำน้ำเข้าสู่บ่อเลี้ยง (3) สุ่มตรวจสัตว์พาหะนำโรค เช่น ปูเปี้ยว กุ้งกะต๋อม
 เป็นต้น ซึ่งพบได้ในฟาร์ม รวมทั้งกุ้งธรรมชาติที่อาศัยในคลองส่งน้ำและบ่อพักน้ำ เพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อน
ของเชื้อโรคเข้าสู่ฟาร์ม (4) สุ่มตรวจกุ้งอ่อนแอในบ่อเลี้ยง เพื่อให้รู้โรคเร็วและแก้ปัญหาได้เร็ว หากพบว่ากุ้ง
ในบ่อติดเชื้อโรคโดยเฉพาะเชื้อโรคไวรัสดวงขาว ให้ทำการปิดบ่อทันที ซึ่งหมายถึง การปิดเครื่องตีน้ำ ล้อม
กันสัตว์พาหะนำโรคข้ามบ่อ ลงสารเคมีกำจัดกุ้งและสัตว์พาหะนำโรค เช่น ไตรคลอฟอน ทั้งนี้เพื่อป้องกัน
การแพร่กระจายของเชื้อ (5) แจ้งข่าวเมื่อพบเชื้อโรคร้ายแรงในฟาร์มแก่กลุ่มฟาร์มที่ร่วมใช้แหล่งน้ำ หรือ
ชมรมผู้เลี้ยงกุ้ง รวมทั้งหน่วยงานราชการ เพื่อการเฝ้าระวังและควบคุมโรคที่เหมาะสม (6) ควรกำจัดสัตว์
พาหะทั้งระบบฟาร์มหลังรอบการผลิต (อาจเรียกว่า การเคลียร์ฟาร์ม) โดยเฉพาะฟาร์มที่เสี่ยงหรือมีประวัติ
กุ้งป่วยติดเชื้อไวรัส (7) เลือกซื้อลูกกุ้งจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่ใช้วิธีผลิตลูกกุ้งโดยระบบป้องกันการติดเชื้อที่
ถูกต้อง หรือซื้อลูกกุ้ง SPF (specific-pathogen-free) พร้อมตรวจลูกกุ้งด้วยวิธี PCR เป็นระยะๆ ก่อนส่ง
ลูกกุ้งสู่ฟาร์มเลี้ยง (ข้อมูลจากชมรมผู้เลี้ยงกุ้งสุราษฎร์ธานี และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคุณเอกพจน์ ยอดพินิจ ประธานชมรมผู้เลี้ยงกุ้งสุราษฎร์ธานี นายสัตวแพทย์สุรศักดิ์
ดิลกเกียรติ สมาชิกชมรมทุกท่าน และทันตแพทย์สุรพล ประเทืองธรรม นายกสมาคมผู้เลี้ยงกุ้งทะเลไทย
ตลอดจนเจ้าหน้าที่บริษัทเจริญโภคภัณฑ์จำกัด ที่ให้คำปรึกษา วางแผนและช่วยเหลือคณะเจ้าหน้าที่จาก
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ทำให้การพบปะเกษตรกรและการเก็บตัวอย่างเป็นไปอย่างเรียบร้อยและมี
ประสิทธิภาพ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สำนักงานสุขภาพสัตว์และสุขอนามัยที่ 8 จังหวัดสุราษฎร์ธานี
สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดสุราษฎร์ธานี และ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ จังหวัด
นครศรีธรรมราช ที่ได้ลงพื้นที่พบปะเกษตรกรและเก็บตัวอย่างร่วมกัน

เอกสารอ้างอิง

- Bonami, J.R., Bruce, L.D., Poulos, B.T., Mari, J. and Lightner, D.V. 1995. Partial characterization and cloning of the genome of PVSNPV (BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. Dis. Aquat. Org. 23: 59–66.
- Bonami, J.R., Trumper, B., Mari, J., Brehelin, M. and Lightner, D.V. 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. J. Gen. Virol. 71: 2657–2664.
- Khawsak, P., Deesukon, W., Chaivisuthangkura, P. and Sukhumsirichart, W. 2008. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection for six viruses of penaeid shrimp. Mol. Cell. Probes. 22: 177–183.
- Lightner, D.V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases for cultured penaeid shrimp, CD-ROM version. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. p. 1–72.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu, K.F., Chiu, Y.L. and 8 others. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. Dis. Aquat. Org. 30: 53–72.
- Loy, J.K., Dewhirst, F.E., Weber, W., Frelie, P.F., Garber, T.L., Tasca, S.I. and Templeton, J.W. 1996. Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3439–3445.
- NCBI. 2009a. "Nucleotide – Baculovirus penaei unknown sequence (GenBank: DQ496179)." U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI). [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/95020642>
- NCBI. 2009b. "Nucleotide – Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, complete genome (GenBank: AF218266)." U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI). [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF218266>
- NCBI. 2009c. "Nucleotide – Unidentified alpha proteobacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GenBank: U65509)." U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI). [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1737125>
- Nunan, L.M., Poulos, B.T. and Lightner, D.V. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura syndrome virus (TSV) in experimentally infected shrimp. Dis. Aquat. Org. 34:87–91.

- OIE. 2009a. Aquatic animal health code. Aquatic Animals Commission, OIE (World Organisation for Animal Health), Paris, France. [Online]. Available:
http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_sommaire.htm
- OIE. 2009b. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. Aquatic Animals Commission, OIE (World Organisation for Animal Health), Paris, France. [Online]. Available:
http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm
- Pantoja, C.R. and Lightner, D.V. 2000. A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 39:177–82.
- Poulos, B.T., Tang, K.F.J., Pantoja, C.R., Bonami, J.R. and Lightner, D.V. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. J. Gen. Virol. 87: 987–996.
- Surachetpong, W., Poulos, B.T., Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 2005. Improvement of PCR method for the detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. Aquaculture. 249: 69–75.
- Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. 1999. A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for in situ hybridization. Dis. Aquat. Org. 35: 165–173.
- Wongteerasupaya, C., Tongchuea, W., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A. and Withyachumnarnkul, B. 1997. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Dis. Aquat. Org. 31:181–186.
- Xie, Z., Pang, Y., Deng, X., Tang, X., Liu, J. and Lu, Z. 2007. A multiplex RT-PCR for simultaneous differentiation of three viral pathogens of penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 76: 77–80.

PCR-based detection of 9 major pathogens of penaeid shrimp

Thinnarat Srisuvan* Tuangthong Patchimasiri Supansa Tangdee

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, 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

Polymerase chain reaction (PCR) was developed for detection of 9 major shrimp pathogens, including white spot syndrome virus (WSSV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV), hepatopancreatic parvovirus (HPV), baculovirus penaei (BP), monodon baculovirus (MBV), Taura syndrome virus (TSV), yellow head virus (YHV), infectious myonecrosis virus (IMNV), and necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB). Nine primer sets could amplify pathogen nucleic acids resulting in PCR products with different sizes. These primers were highly specific and did not cross-hybridize with other pathogen- or shrimp-nucleic acids. The sensitivity of the developed PCR was higher than other widely used protocols. This method was validated on 65 shrimp samples collected from ponds in Suratthani province, Thailand in 2009. The results revealed that single infection of WSSV was detected in 5 of 65 samples (7.69%), whereas other infection was not found. Therefore, the developed PCR is capable of detecting 9 major pathogens of penaeid shrimp and benefits for the prevention and control of diseases in cultured shrimp ponds.

Keywords : penaeid shrimp, WSSV, IHHNV, HPV, BP, MBV, TSV, YHV, IMNV, NHPB