

โรคอุบัติใหม่: การติดเชื้อไวรัสอัมพาตของจิ้งหรีดเลี้ยง ในประเทศไทย และการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม

นพพร โต๊ะมี* ทวีวัฒน์ ดีมะการ พิชรี ทองคำคุณ มณฑกานต์ วงศ์ภากร สุพรรณษา ทางดี

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง แขวงลาดยาว จตุจักร กทม. 10900

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14, e-mail: noppornt@dld.go.th

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสอัมพาตจิ้งหรีด (*Cricket Paralysis Virus*; CrPV) ชนิด RNA สายเดี่ยว positive-sense เป็นสาเหตุให้เกิดโรคอัมพาตในจิ้งหรีดในหลายประเทศ จิ้งหรีดจะแสดงอาการเป็นอัมพาต หายหลัง ชัก และตาย วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของโรคอัมพาตจิ้งหรีดเลี้ยงในประเทศไทย โดยนำตัวอย่างจิ้งหรีดที่แสดงอาการป่วย มาทำการสกัด RNA และนำเข้าสู่กระบวนการ RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่ง noncoding region (NCR), intergenic region (IGR) และ RNA dependent RNA polymerase (RdRp) ผลผลิตที่ได้มีขนาด 705 bp 207 bp และ 1.2 kb จากนั้นหาลำดับเบสเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล มีความคล้ายกับลำดับเบสของ CrPV [NC003924] ที่ 83% 88% และ 90% ตามลำดับ นอกจากนี้ตำแหน่งของ RdRp ที่แปลงเป็นรหัสโปรตีน (Non-structural protein) มีความคล้ายกับโปรตีนของเชื้อ CrPV [NP_64748.1] 94% จากผลของการตรวจพบ RNA และความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของไวรัสในจิ้งหรีดระบุได้ว่าเป็น CrPV ที่เป็นสาเหตุทำให้จิ้งหรีดในฟาร์มเกิดเป็นอัมพาต และตาย ซึ่งการรายงานการเกิดโรคอุบัติใหม่ของจิ้งหรีดเลี้ยงนี้เป็นการรายงานครั้งแรกในประเทศไทย

คำสำคัญ: การวิเคราะห์ทางพันธุกรรม โรคอุบัติใหม่ เชื้อไวรัสอัมพาตจิ้งหรีด จิ้งหรีดเลี้ยง โรคอัมพาต ชัก

บทนำ

Cricket paralysis virus (CrPV) เป็น single strand positive-sense RNA (Eaton and Steacie, 1980; Moore *et al.*, 1981; Reavy and Moore., 1983; King *et al.*, 1984) พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 โดย Carl Reinganum สังเกตพบจากฝูงของจิ้งหรีดธรรมชาติสายพันธุ์ออสเตรเลียสองสายพันธุ์ (*Teleogryllus oceanicus* และ *T. commodus*) ที่เลี้ยงอยู่ในห้องปฏิบัติการ แสดงอาการผิดปกติของตัวอ่อนในระยะต้น เริ่มจากขาหลังเดินไม่สัมพันธ์กัน เป็นอัมพาต และตาย ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคของไวรัสจำนวนมากในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ (Reinganum *et al.*, 1970) แม้ว่าเริ่มแรกจะแยกเชื้อ CrPV ได้จากจิ้งหรีด แต่ก็พบว่า CrPV มีแพร่กระจายในแมลงตามธรรมชาติอย่างกว้างขวาง (Reinganum *et al.*, 1981) เช่น แมลงกลุ่ม Diptera, Lepidoptera, Orthoptera และ Heteroptera (Reinganum *et al.*, 1970; Christian and Scotti 1998) ที่สำคัญกว่านี้คือเชื้อนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลงหลายชนิดรวมถึงเซลล์แมลงหวี่ SL2 (Scotti 1976; Moore *et al.*, 1980)

เดิมจัด CrPV อยู่ในกลุ่มของ insect picorna-like viruses เนื่องจากมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างโปรตีนหลายชนิดที่คล้ายกันกับ picornaviruses ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Moore *et al.*, 1980; Scotti *et al.*, 1981; Tate *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000) ต่อมาการโคลน และการหาลำดับสารพันธุกรรมของ insect picorna-like viruses หลายชนิดได้แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างจีโนมของ CrPV แตกต่างจาก picornaviruses ที่ก่อโรคในมนุษย์ (Koonin and Gorbalenya, 1992; Christian and Scotti, 1998) ซึ่ง CrPV จะมี 2 open reading frame (ORFs) โดย ORF1 และ ORF2 จะเป็นส่วนที่แปลรหัสในการสร้าง nonstructural protein และ structural protein ตามลำดับ มีการทำหน้าที่เป็นอิสระจากกัน จากการศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของ CrPV พบว่าตำแหน่งของ internal ribosome entry site (IRES) ใน intergenic region (IGR) หรือเรียกว่า intergenic region IRES (IGR IRES) จะเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของแต่ละ ORF และเป็นส่วนอนุรักษ์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการเข้าสู่เซลล์ เป้าหมายของเชื้อไวรัสหลายชนิดให้ได้เป็นผลสำเร็จ (Tate *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000; Pfingsten *et al.*, 2007; Bonning, 2009; Pfingsten *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในยีนส่วนของ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์หลักที่สำคัญ ที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของ RNA polymerase รวมถึงกรดอะมิโนที่สำคัญและมีผลกระทบต่อการทำงานของเอ็นไซม์ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิด และศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสชนิด RNA (Koonin and Dolja, 1993; Tentcheva *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2005; Blanchard *et al.*, 2007; Baker and Schroeder, 2008) ปัจจุบัน CrPV จัดอยู่ใน Order: Picornavirales Family: Dicistroviridae และ Genus: Cripavirus ที่ได้รับการรับรองจาก International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) ในปี ค.ศ. 2012 (ICTV, 2013)

ประเทศไทยยังไม่มีเคยมีรายงานการระบาดของโรค CrPV ในจิ้งหรีดมาก่อน แต่ Tohme et al. (2008) ได้เคยรายงานการติดเชื้อ Iridovirus ในจิ้งหรีดในฟาร์มเพาะเลี้ยง จ.ลำพูน ที่เป็นสาเหตุให้จิ้งหรีดป่วย ตายเป็นจำนวนมาก ซึ่งจากลักษณะการป่วย และการตายของจิ้งหรีดในปัจจุบันนั้นแตกต่างไปจากเดิม ดังนั้นทีมผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจวินิจฉัย เพื่อศึกษาพันธุกรรมของเชื้อไวรัส และหาสาเหตุการตายของจิ้งหรีดในฟาร์มเพาะเลี้ยง ในครั้งนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติ

ฟาร์มจิ้งหรีด จากจังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม และเชียงใหม่ นิยมเพาะเลี้ยงจิ้งหรีด (*Acheta domestica*, *A. testacea* และ *Gryllus bimaculatus*) ในบ่อสี่เหลี่ยม ยกพื้น ทำด้วยแผ่นกระเบื้องเรียบ ขนาด (กว้างXยาวXสูง) 1.2X2.4X0.8 เมตรโดยประมาณ มีภาชนะรองกันมด และแมลงที่ขาทั้งสี่ข้าง พร้อมมุ้งครอบด้านบน ภายในมีการใช้ถาดรองไข่ (ชนิดเยื่อกระดาษ) วางรองเป็นชั้นๆ ค้ำยคอนโดมิเนียมให้เป็นที่ยึด และหลบภัย (Fig.1) มีจิ้งหรีดประมาณ 40,000 ตัว/บ่อ บางรายใช้วงปูน หรือ บ่อคอนกรีตแบบเดิมตั้งบนพื้น พบจิ้งหรีดขนาดเล็กตายทันทีโดยไม่แสดงอาการให้เห็น และตายมาอย่างผิดปกติ ส่วนจิ้งหรีดขนาดใหญ่จะแสดงอาการไม่ค่อยเคลื่อนไหว ชักให้เห็นก่อนตาย ส่วนอัตราการตายแตกต่างกันไปตามชนิดสายพันธุ์ รูปแบบการเลี้ยง วัย และฤดูกาล

ตัวอย่าง

ตัวอย่างจิ้งหรีดป่วยส่งตรวจที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และตัวอย่างจิ้งหรีดป่วยสามสายพันธุ์ที่ออกเก็บเพิ่มเติมจากจังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บระยะตัวอ่อน และระยะวัยเจริญพันธุ์ ตัวอย่างละประมาณ 20 ตัว ไข่จิ้งหรีดประมาณ 50-100 ฟอง/ตัวอย่าง ชิ้นส่วนถาดรองไข่ขนาดประมาณ 10X10 เซนติเมตร/ตัวอย่าง บรรจุตัวอย่างในถุงพลาสติก รัดปากถุงด้วยยางให้แน่นแช่ในน้ำแข็ง และเก็บในวัสดุรักษาความเย็น ส่งตรวจหาสาเหตุการตายที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

การตรวจทางปรสิตวิทยา พยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยา

นำตัวอย่างจิ้งหรีดมาทำการตรวจดูลักษณะภายนอก และทำการเปิดผ่าซาก โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด สเตอริโอ เพื่อดูลักษณะผิดปกติ และตรวจหาไร นำบางส่วนของอวัยวะภายในมาทำ Impression smear ย้อมด้วยสี Giemsa ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างธรรมดา เพื่อตรวจหาเชื้อโปรโตซัว จากนั้นนำส่วนที่เหลือทั้งหมดใส่ลงในน้ำยา 10% Neutral buffered formalin เข้าสู่กระบวนการมาตรฐานทางพยาธิวิทยา และย้อมด้วยสี Haematoxylin & Eosin (Luna, 1968) แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างธรรมดา เพื่อสังเกตลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างจิ้งหรีดจุ่มใน 70% ethanal แล้ววางบนกระดาษซับ ซับให้แห้ง หลังจากนั้นเปิดฝาช่องท้อง ใช้ Loop เขี่ยของเหลวในช่องท้อง และอวัยวะภายใน เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Blood agar base No.2 ที่ผสมเลือดแกะ 5% และ MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° C 24 ชม. และทำการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ได้ตามวิธีของ Quinn et al. (1994)

การตรวจหาไวรัสด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา

แบ่งตัวอย่างจิ้งหรีด ไข และถาดรองไขเป็นสองชุด นำมาทำการสกัด DNA และ RNA ด้วย QIAamp Tissue DNA Minikit (QIAGEN, USA) และ QIAamp Viral RNA Minikit (QIAGEN, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิตตามลำดับ นำผลผลิตที่ได้เก็บรักษาไว้ที่ -20° C ก่อนที่จะนำมาใช้เป็นต้นแบบ (template) ในกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction; PCR) ในส่วนของ major capsid protein (MCP) สำหรับ Iridovirus และ non coding region (NCR), IGR IRES และ RdRp สำหรับ CrPV โดยมีส่วนผสมในปริมาณ 25 µl ต่อตัวอย่าง สำหรับตรวจหา DNA ของเชื้อ Iridovirus ใช้ High Fidelity PCR Buffer 1X, dNTP 0.2 mM (each), MgSO₄ 2 mM, Platinum[®] Taq (Invitrogen, USA) 1 unit/reaction, Primer (Table1) MCPF and MCPR 0.2 µM (each) และสำหรับการทำ RT-PCR ในการตรวจหา RNA ของเชื้อ CrPV ใช้ 2X Reaction mix 1X, Super Script III One-step/Platinum Taq 400 µM, Primer (Table1) F and R (NCR, IGR, CrPV) 0.3 µM (each) แล้วเติม DNA และ RNA ต้นแบบอย่างละ 1 µl และ น้ำกลั่น โดยมีขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ด้วยเครื่อง GeneAmp PCR system 9700 (PE-Applied Biosystems/FOSTER CITY, CA) โดยมีเงื่อนไขสำหรับ Iridovirus คือ Pre-denaturation 94° C 5 min 1 Cycle, 35 Cycle ของ Denaturation 94° C 1 min, Annealing 50° C 1 min, Extension 72° C 2 min และ Final Extension 72° C 7 min ที่ 1 Cycle และเงื่อนไขสำหรับ CrPV คือ Reverse transcription 50° C 30 min 1 Cycle, Initial Denaturation 95° C 5 min 1 Cycle และ 35 Cycle ของ Denaturation 95° C 30 sec, Annealing 55° C (45° C for CrPVF, R) 30 sec, Extension 72° C 1 min (2 min for CrPVF, R) และ Final Extension 72° C 7 min 1 Cycle จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาทำ electrophoresis ใน 0.8% agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide และนำมาอ่านผลที่ได้ด้วย UV-transilluminator จากนั้นนำ PCR products ที่ได้มาทำการโคลนด้วย TA cloning kit (Invitrogen, USA)

Table1 Primer sequence for Iridovirus DNA and CrPV RNA diagnosis

Primer	Sequence	Product size	Reference
MCPF	5'-GGTTTCATCGATATCGCCAC-3'	1 kb	Jakob et al. (2002)
MCPR	5'-GAAAAGTAATCACTGCCCCAT-3'		
NCRF	5'-AGAATTCTTTAATAAGTGTGTGCAGATTAATCTGC ACAGCACTAGCC-3'	705 bp	Wilson et al. (2000)
NCRR	5'-GCCATGGCTACATTGTAAGAATCGGTTACTCC-3'		
IGRF	5'-CGGAATTCAAAGCAAAAATGTGATCTTGCTT-3'	207 bp	Wilson et al. (2000)
IGRR	5'-CATGCCATGGTATCTTGAAATGTAGCAGGTAAA-3'		
RdRpF	5'-CAGGCGAGCAATATGACT-3'	1.2 kb	This study
RdRpR	5'-TAACCTCTCAAAATTGTA-3'		

การหาลำดับเบส

นำ PCR products ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด MinElute™ PCR Purification Kit (50) (QIAGEN, USA) และนำไปหาค่าความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 นำ PCR products ที่ได้มาเป็นต้นแบบ โดยมีส่วนผสมของ sequencing reaction ตาม ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, California) โดยใช้ primer M13 นำไปเข้าเครื่อง GeneAmp PCR system 9700 (PE-Applied Biosystems/FOSTER CITY, CA) จำนวน 25 รอบ ตามเงื่อนไขดังนี้ denaturation 96°C นาน 10 วินาที annealing 50° C นาน 5 วินาที extension 60° C นาน 4 นาที จากนั้นนำเข้าทำการอ่านลำดับเบสในเครื่อง 3130 Genetic Analyzer ของ ABI Applied Biosystem (HITACHI, Japan)

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้ทั้งสองสายมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม (ฟรีซอฟต์แวร์) Chromaspro (version 1.5) MEGA (version 5.2) BioEdit (version 7.0.5) และ BLAST program เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ Iridovirus และ CrPV ใน GenBank จากนั้นได้ดำเนินการทำ Multiple sequence alignments โดยใช้ ClustalW program และวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้โดยใช้วิธี neighbor-joining ที่ระดับความเชื่อมั่น bootstrap 1,000 รอบซ้ำ ลำดับเบสและกรดอะมิโนของเชื้อไวรัส (accession numbers) ที่ใช้ในการ alignments คือ Cricket Paralysis Virus (CrPV) [NC003924, AAF80998], Drosophila C virus (DCV) [NC004365, AAC58807], Aphid lethal paralysis virus (ALPV) [NC004365, AAN61470], Black queen cell virus (BQCV) [NC003784] และ Rhopalosiphum padi virus (RhPV) [AAC95509]

ผลการทดลอง

การตรวจทางปรสิตวิทยา พยาธิวิทยา และแบคทีเรียวิทยา

จากการตรวจดูลักษณะภายนอกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างธรรมดา ไม่พบลักษณะผิดปกติ ไม่พบไรภายนอก และโปรโตซัวในระบบทางเดินอาหารจากตัวอย่างจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดเชียงใหม่ แต่พบว่าตัวอย่างจิ้งหรีดจากจังหวัดมหาสารคามแสดงอาการท้องบวม (Fig.2) ไม่พบไร และโปรโตซัวเช่นกัน เมื่อเปิดผ่าซากพบลักษณะไขมันสีขาวมัววเต็มช่องท้อง (Fig.3) สัมผัสกับอากาศจะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าอ่อน ผลทางจุลพยาธิวิทยาพบลักษณะการเสื่อมสภาพของเซลล์ไขมันในช่องท้อง มีลักษณะขยายใหญ่ ไฮโดพลาสซึม ติดสีน้ำเงินอมม่วง (Basophilic intracytoplasmic inclusion bodies) ตัวอย่างซากจิ้งหรีดจากจังหวัดนครราชสีมา และเชียงใหม่ไม่พบสิ่งผิดปกติ (Fig.4) ส่วนผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียพบ *Enterococcus* spp. ดังแสดงใน Table2

การตรวจไวรัสด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา และการวิเคราะห์ลำดับเบส

ผลจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของตำแหน่ง MCP, NCR, IGR และ RdRp พบแถบดีเอ็นเอขนาดความยาวประมาณ 1 kb, 705 bp, 207 bp และ 1.2 kb ตามลำดับ (Fig.5, Table2) ผลจากการหาลำดับเบส และนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสใน GenBank พบว่าลำดับเบสของ MCP มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ *Gryllus bimaculatus iridovirus* major capsid protein gene (GIV-MCP) [AF247641] 97% และลำดับเบสของ NCR, IGR, RdRp มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของ CrPV [NC003924] ที่ 83%, 88% และ 90% ตามลำดับ จากนั้นนำลำดับเบสในส่วนของ IGR (cases1,2 และ 3) มาสร้างแผนภูมิต้นไม้พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มของ CrPV [NC003924] (Fig.6) เมื่อนำลำดับเบสของ RdRp มาแปลงเป็น amino acid แล้วเปรียบเทียบกับ amino acid ใน GenBank พบว่ามีความคล้ายกับ Nonstructural Polyprotein ของ CrPV [NP_647481.1] 94% (Fig.7) และเมื่อนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้พบว่ามีความใกล้ชิดกับ CrPV [AAF80998] (Fig.8)

วิจารณ์และสรุป

จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ไม่พบโปรโตซัว และไร ซึ่งต่างจากที่ Tohmee et al. (2008) ได้รายงานไว้ว่ามีการพบไรชนิด *Trombidiform* mite จากตัวอย่างจิ้งหรีดในจังหวัดลำพูน แต่การศึกษาค้างนี้พบเชื้อแบคทีเรียชนิด *Enterococcus* spp. (ทุกตัวอย่างยกเว้นไขจิ้งหรีดและถาดรองไข่) ของเหลวสีขาวมัววในช่องท้อง และลักษณะเฉพาะของการติดเชื้อ Iridovirus คือ basophilic intracytoplasmic inclusion body เฉพาะตัวอย่างจากจังหวัดมหาสารคาม ส่วนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วน MCP พบได้จากตัวอย่างจากจังหวัดมหาสารคาม และจิ้งหรีดวัยเจริญพันธุ์จากจังหวัดเชียงใหม่ ที่สอดคล้องกันกับรายงานของ Hall (1989), Kleespies et al. (1999), Jakob et al. (2002) และ Tohmee

et al. (2008) ตามข้อมูลใน Table2 นอกจากนั้นได้ทำการหาลำดับเบสของ MCP เปรียบเทียบกับข้อมูลเดิมในฐานข้อมูล พบว่าไม่มีความแตกต่างของสารพันธุกรรม แสดงให้เห็นถึงการระบาดของ Iridovirus ยังมียู่แพร่

ส่วนการตายที่ผิดปกติของจิ้งหรีดจากจังหวัดนครราชสีมา และเชียงใหม่ พบว่าจิ้งหรีดวัยอ่อนตายโดยที่ไม่ทันสังเกตอาการ ส่วนจิ้งหรีดวัยเจริญพันธุ์แสดงอาการกระตุก ไม่ค่อยเคลื่อนไหวเนื่องจากขาหลังไม่มีแรง และชักร่อนตาย สอดคล้องกับที่ Reinganum *et al.* (1970) ได้รายงานไว้ เป็นเหตุให้สงสัยการติดเชื้อ CrPV ซึ่งจากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบสิ่งผิดปกติ เนื่องจากเชื้อ CrPV ไม่สร้าง inclusion body ในเซลล์ การศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำได้ยากจำเป็นต้องใช้ชิ้นส่วนของแมลงที่คาดว่าจะติดเชื้อไวรัสจำนวนมากมาทำการย่อย และกรอง หรือทำการตัดบล็อกเนื้อเยื่อให้ผ่านตำแหน่งเส้นประสาทที่มีเชื้อไวรัสอยู่จึงจะเห็นตัวไวรัสได้ (Reinganum *et al.*, 1970) ปัจจุบันวิทยาการด้านอณูชีววิทยามีความก้าวหน้า และเป็นที่ยอมรับในการนำมาตรวจหาชิ้นส่วน RNA ของเชื้อไวรัส จึงได้นำเทคนิค RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาตำแหน่งของ NCR และ IGR IRES ด้วย primer ที่มีความจำเพาะ (Wilson *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์เกี่ยวกับการทำหน้าที่ในการเข้าจับเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัส (Tate *et al.*, 1999; Pfingsten *et al.*, 2007) และการหาตำแหน่งของ RdRp ด้วย primer จำเพาะที่สร้างขึ้น ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์เกี่ยวกับการทำหน้าที่ของ enzyme และนิยมนำมาใช้ในการจัดกลุ่ม และจัดอันดับของเชื้อไวรัสที่มีการติดเชื้อในแมลง (Baker and Schroeder, 2008) เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หาลำดับเบส และเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลเนื่องจากไม่มีตัวควบคุมบวกในตำแหน่งของ NCR และ IGR IRES พบว่าสอดคล้องกับที่ Wilson *et al.* (2000) ได้รายงานไว้ ส่วนตำแหน่งของ RdRp เมื่อทำการหาลำดับเบสและแปลงเป็น amino acid และเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลพบว่ามีคล้ายกับ Nonstructural Polyprotein ของ CrPV [NP_647481.1] 94% และเมื่อนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้พบว่ามีความใกล้ชิดกับ CrPV [AAF80998]

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าจิ้งหรีดที่ป่วย ตายผิดปกตินี้เกิดจากการติดเชื้อ CrPV เป็นการอุบัติของไวรัสชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีการตรวจพบในจิ้งหรีดในประเทศไทยมาก่อน ซึ่งทำความเสียหายให้กับวงการเพาะเลี้ยงจิ้งหรีดอย่างมากไม่น้อยไปกว่าการติดเชื้อ Iridovirus ทีมผู้วิจัยเห็นว่าเทคนิค RT-PCR มีความเหมาะสมในการนำมาตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ CrPV อย่างไรก็ตาม CrPV มีการแพร่ระบาดกระจายไปทั่วโลก การเฝ้าระวังโรค โดยการสำรวจหาความชุก แหล่งที่มา การแพร่กระจาย และความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด เนื่องจากตัวอย่างที่ได้รับจากจังหวัดเชียงใหม่ให้ผลบวกของ Iridovirus ในจิ้งหรีดวัยเจริญพันธุ์ และให้ผลบวกของ CrPV ในจิ้งหรีดวัยอ่อนเป็นจิ้งหรีดจากฟาร์มเดียวกัน การวิเคราะห์รหัสทางพันธุกรรมทั้งหมดของเชื้อไวรัสในแต่ละพื้นที่จะทำให้ทราบความผันแปรของ CrPV และระบาดวิทยาของโรคในประเทศไทยเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประกอบการศึกษาการควบคุม ป้องกันการเกิดโรคระบาดต่อไป

Table 2 Laboratory result

Province	Sample	Laboratory result					
		External parasite	Swollen abdomen	Inclusion bodies in fat cells	Bacterial culture	PCR (Iridovirus)	PCR (Cricket Paralysis virus)
Chiang Mai	Adult cricket	-	-	-	<i>Enterococcus</i> spp.	+	-
	Young cricket	-	-	-	<i>Enterococcus</i> spp.	-	+
Maha Sarakham	Adult cricket	-	+	+	<i>Enterococcus</i> spp.	+	-
	Young cricket	-	-	+	<i>Enterococcus</i> spp.	+	-
Nakhon Ratchasima	Adult cricket	-	-	-	<i>Enterococcus</i> spp.	-	+
	Young cricket	-	-	-	<i>Enterococcus</i> spp.	-	+
a	Cricket eggs	-	-	NA	-	-	+
	Egg tray	-	-	NA	NA	-	+

หมายเหตุ (-) = ผลลบ, (+) = ผลบวก, (NA) = ไม่ได้ตรวจ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการศึกษาขอขอบคุณ สพ.ญ. วรธิดา แสงรัตน์ และ คุณอุเทน บุญยัง เจ้าหน้าที่ของบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ ที่ช่วยอนุเคราะห์ แนะนำฟาร์ม และการเก็บตัวอย่างพร้อมรายงานปัญหาการตายอย่างผิดปกติของจิ้งหรีดในครั้งนี้ และขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ชัยโรจน์ โพธิ์เจริญ สังกัดสำนักงานเขต 5 กรมปศุสัตว์ ที่ช่วยเก็บและจัดส่งตัวอย่างจิ้งหรีดจากฟาร์มที่มีปัญหาที่จังหวัดเชียงใหม่ และเจ้าหน้าที่ของสถาบันสุขภาพสัตว์ทุกท่านที่ช่วยให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Baker, A.C. and Schroeder D.C. 2008. The use of RNA-dependent RNA polymerase for the taxonomic assignment of Picorna-like viruses (order *Picornavirales*) infecting *Apis mellifera* L. Populations. J. Virol. 5: 1-10.
- Blanchard, P., Ribiere M., Celle O., Lallemand P., Schurr F., Olivier V., Iscache A.L. and Faucon J.P. 2007. Evaluation of a real-time two-step RTPCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. J. Virol. Methods. 141: 7-13.
- Bonning, B.C. 2009. The Dicistroviridae: An Emerging Family of Invertebrate Viruses. Virol. Sin. 24: 415-427.
- Chen, Y., Higgins J.A. and Feldlaufer M. 2005. Quantitative real time reverse transcription PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera*). Appl. Environ. Microbiol. 71: 436-441.
- Christian, P.D. and Scotti P.D. 1998. Picornalike viruses of insects. In: The insect viruses. Miller, L.K. and Ball, L. A. Plenum Publishing Corp., New York. pp. 301-306.
- Eaton, B.T. and Steacie A.D. 1980. Cricket paralysis virus RNA has a terminal poly (A). J. Gen. Virol. 50: 167-171.
- Hall, D.W. 1989. Pathobiology of Icosahedral Cytoplasmic Deoxyriboviruses (Iridoviridae). In (K. Maramorosch and K.E. Sherman, Eds.). "Viral Insecticides for Biological Control" n.p. pp. 163-196.
- International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV). 2013. Virus taxonomy: 2012 Online Available: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>, January 21, 2013.
- Jakob, N.J., Kleespies R.G., Tidona C.A., Muller K., Darai 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.
- King, L.A., Massalski P.R., Cooper J.I. and Moore N.F. 1984. Comparison of the genome sequence homology between Cricket paralysis virus and strains of *Drosophila C* virus by complementary DNA hybridization analysis. J. Gen. Virol. 65: 1193-1196.
- Kleespies, R.G., Tidona G.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.

- Koonin, E.V. and Dolja W. 1993. Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 375-430.
- Koonin, E.V. and Gorbalenya A.E. 1992. An insect picornavirus may have genome organization similar to that of caliciviruses. *FEBS Lett.* 297: 81-86.
- Luna, L.G. 1968. *Manual of Histologic Staining Method of the Arm Forces Institute of Pathology.* 3rd ed. McGraw-Hill Book Company. New York, USA. pp. 1-38.
- Moore, N.F., Kearns A. and Pullin J.S.K. 1980. Characterization of cricket paralysis virus-induced polypeptides in *Drosophila* cells. *J. Virol.* 33: 1-9.
- Moore, N.F., Reavy B. and Pullin J.S.K. 1981. Processing of cricket paralysis virus induced polypeptides in *Drosophila* cells: production of high molecular weight polypeptides by treatment with iodoacetamide. *Arch. Virol.* 68: 1-8.
- Pfingsten, J.S., Castile A.E. and Kieft J.S. 2010. Mechanistic role of structurally dynamic regions in the *Dicistroviridae* IGR IRESs. *J. Mol. Biol.* 395(1): 205-217.
- Pfingsten, J.S., Costantino D.A. and Kieft J.S. 2007. Conservation and diversity among the three-dimensional folds of the *Dicistroviridae* intergenic region IRESes. *J. Mol. Biol.* 370: 856-869.
- Quinn, P.J., Carter M.E., Markey B. and Carter G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology.* Mosby-Year Book Europe Limited. London England. pp. 1-648.
- Reinganum, C., Gagen S.J. and Sexton S.B. 1981. A survey of pathogens of the black field cricket, *Teleogryllus commodus*, in the Western District of Victoria, Australia. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 153.
- Reinganum, C., O'Loughlin G.T. and Hogan T.W. 1970. A non-occluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera: Gryllidae). *J. Invertebr. Pathol.* 16: 214-220.
- Reavy, B. and Moore N.F. 1983. The gene organization of a small RNA-containing insect virus: comparison with that of mammalian picornaviruses. *Virol.* 131: 551-554.
- Scotti, P.D., Longworth J.F., Plus N., Crozier C. and Reinganum C. 1981. The biology and ecology of strains of an insect small RNA virus complex. *Adv. Virus. Res.* 26: 117-143.

- Scotti, P. D. 1976. Cricket paralysis virus replicates in cultured *Drosophila* cells. Interviol. 6: 333–342.
- Shen, M., Yang X., Cox-Foster D. and Cui L. 2005. The role of *Varroa* mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honeybees. J. Virol. 342: 141-149.
- Tate, J., Liljas L., Scotti P., Christian P., Lin T. and Johnson J.E. 1999. The crystal structure of cricket paralysis virus: the first view of a new virus family. Nat. Struct. Biol. 6: 765–774.
- Tentcheva, D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E. and Bergoin M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7185-7191.
- Tohmee, N., Patchimasiri T., Wongpakorn M. and Srisuvan. T. 2008. Iridovirus infection in cricket farm in Lampoon province. J. Mahanakorn. Vet. Med. 3 (2): 40-50.
- Wilson, J.E., Powell M.J., Hoover S.E. and Sarnow P. 2000. Naturally Occurring Dicistronic Cricket Paralysis Virus RNA Is Regulated by Two Internal Ribosome Entry Sites. J. Mol. Cell. Biol. 20 (14): 4990-4999.

ภาคผนวก



Fig.1 Cricket pond



Fig.2 Swollen abdomen of Cricket



Fig.3 Pathological lesion were bluish iridescence of abdominal fluid when exposed to the air.



Fig.4 Pathological lesion in normal abdominal cricket



Fig.5 No.1 = DNA marker 1 Kb, No.2 and 3 = Iridovirus 1 Kb, No.4 and 5 = CrPV (NCR) 705 bp, No.6 and 7 = CrPV (IGR) 207 bp, No.8 and 9 = CrPV (RdRp) 1.2 Kb, No.10 = Iridovirus (Positive control) 1 Kb, No.11 = Negative, No.12 = DNA marker 100 bp

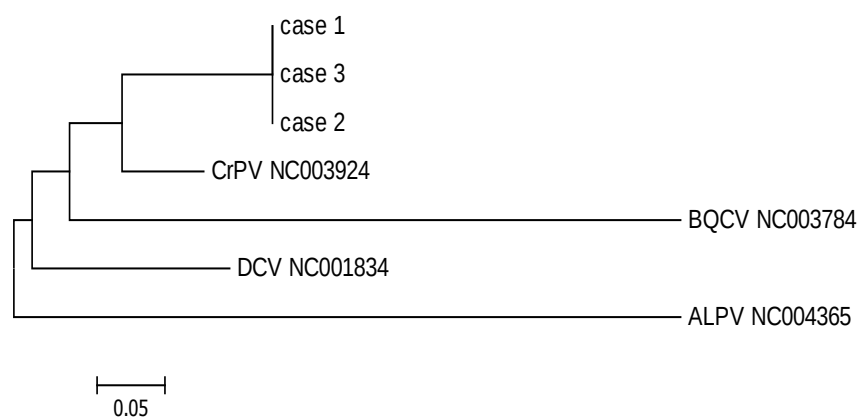


Fig.6 Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the IGR of the cases and member of *Dicistroviridae* including CrPV, *Drosophila C virus* (DCV), *Black queen cell virus* (BQCV) and *Aphid lethal paralysis virus* (ALPV).

nonstructural polyprotein [Cricket paralysis virus]

Sequence ID: [ref|NP_647481.1|](#) Length: 1771 Number of Matches: 1

► [See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 1398 to 1700 [GenPept](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
593 bits(1529)	0.0	Compositional matrix adjust.	284/303(94%)	289/303(95%)	1/303(0%)
Query 1		LRRDVEELIDNCAKGI IKDVVFVDTLKDERRPIEKVDAGKTRVFSAGPQHFFVAFRKYFL	60		
Sbjct 1398		LRRDVEELIDNCAKGI IKDVVFVDTLKDERRPIEKVDAGKTRVFSAGPQHFFVAFRKYFL	1457		
Query 61		PFAAYLMNRRIDNEIAVGNTVYSTDWERIAKRLKKHGKVKVIAGDFGNFDGSLVAQILWAI	120		
Sbjct 1458		PFAAYLMNRRIDNEIAVGNTVYSTDWERIAKRLKKHGKVKVIAGDFGNFDGSLVAQFFGQS	1517		
Query 121		FWEVYYPWFKTFNDVNTETGKRNLMICIGLWTHIVHSVHTYGDNVYMWTHSQPSGNPFTV	180		
Sbjct 1518		CGKSFYYPWFKTFNDVNTEDGKRNLMICIGLWTHIVHSVHSYGDNVYMWTHSQPSGNPFTV	1577		
Query 181		IINCLYNSMIMRIVWILLARKLAPEMQSMKKFRENVSMSISYGDDNCLNIS-RVVEWFNQI	239		
Sbjct 1578		IINCLYNSMIMRIVWILLARKLAPEMQSMKKFRENVSMSISYGDDNCLNIS RVVEWFNQI	1637		
Query 240		TISEQMKEIKHEYTDEGKTGDMVKYRSLSEIQFLKRGFVFSQQQLQRTVAPLQKDVYIEML	299		
Sbjct 1638		TISEQMKEIKHEYTDEGKTGDMVKFPSLSEIHFLKKRFVFSHQLQRTVAPLQKDVYIEML	1697		
Query 300	NWT 302				
Sbjct 1698	NWT 1700				

Fig.7 Alignment of the amino acid sequences of RdRp encoded protein of the case and CrPV [NP_647481.1]

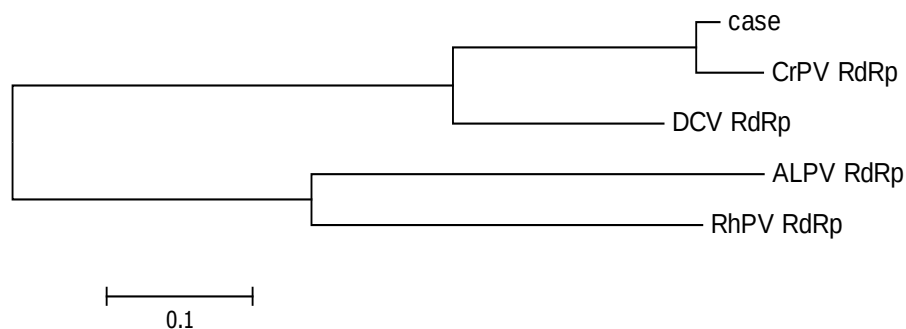


Fig.8 Phylogenetic analysis of amino acid sequences of RdRp encoded protein of the cases and member of *Dicistroviridae* including CrPV, *Drosophila C virus* (DCV), *Aphid lethal paralysis virus* (ALPV) and *Rhopalosiphum padi virus* (RhPV)

Emerging of Cricket Paralysis Virus (CrPV) infections in crickets in Thailand and their genetic analysis

Nopporn Tohmee* Taweewat Deemagarn Pacharee Thongkamkoon
Montakan Vongpakorn Supansa Tangdee

National Institute of Animal Health. Kset klang, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: Tel. 0-2579-8908-14 E-mail: nopporn@dld.go.th

Abstract

Cricket paralysis virus (CrPV), a single strand positive-sense RNA caused paralytic disease in crickets in many countries. The crickets twitched, flipped over their back, paralyzed and died. The aim of this work was to genetic analysis of the *Cricket paralysis virus* infection in crickets in Thailand. Fresh dead crickets which showed clinical signs were extracted for viral RNA. RT-PCR was performed for noncoding region (NCR), intergenic region (IGR) and RNA dependent RNA polymerase (RdRp) of the CrPV genome. The amplified products of NCR, IGR and RdRp were obtained at expected sizes of 705 bp, 207 bp and 1.2 kb and their nucleotide sequences showed 83%, 88% and 90% similarity to those of CrPV (NC003924), respectively. In addition, the amino acid sequence of the non-structural protein encoded by RdRp also had similarity to CrPV [NP_647481.1] 94%. The results indicated that the viral RNA found and genetic similarity in crickets was identified as CrPV a cause of paralysis and death in the cricket farms. This is the first report of CrPV which is the emerging disease of crickets in Thailand.

Keywords: genetic analysis, emerging, cricket paralysis virus, cricket, paralysis, twitch