บทที่ 3

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้ออิริโดไวรัสที่แยกได้จากปลากะพงขาว

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ seabass iridovirus (SIV) โดยการเพิ่มจำนวนอนุภาคในเซลล์ไตปลากะพงขาว (SK) พบว่าไวรัสมีรูปร่างแบบหลายเหลี่ยม (icosahedral) ผนังมีองค์ประกอบของไขมันหุ้ม (lipid envelope) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200-220 นาโนเมตร มีกรดนิวคลิอิกชนิด DNA สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์ SK ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าไตเตอร์ประมาณ $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร และมีค่าลดลงเมื่อถูกแช่แข็งและหลอมละลายหลายๆ ครั้ง เชื้อไวรัสจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ระดับอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือที่ระดับ pH 3 เป็นเวลา 30 นาที สามารถแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ได้ในสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่อง (sucrose continuous gradient) ความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ อนุภาคไวรัสประกอบด้วยโครงสร้างโปรตีนรวม 27 แถบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 21-120 kDa และมีน้ำหนักโมเลกุลรวมประมาณ 1,700 kDa

CHAPTER III

Characterization of an Iridovirus Isolated from Seabass, *Lates calcarifer* (Bloch)

Abstract

The characterization of the seabass iridovirus (SIV) was carried out by using seabass kidney (SK) cells. Transmission electron microscopy revealed the presence of 200-220 nm icosahedral virions surrounded by an lipid envelope. The virus was susceptible and replicated in SK cell at 25 °C, producing a titer of $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/ml. The virus titer was reduced after a freeze-thaw cycle and was completely inactivated at 56 °C or pH 3 within 30 minutes. The virus was also sensitive to chloroform and the replication was suppressed by IUdR, indicating the presence of essential lipids in the envelope and a DNA genome. SIV was able to separate and purify in 10-60 % sucrose continuous gradient and the estimated molecular weight was determined to be 1,700 kDa. In sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis with 10% separating gel, SIV exhibited 27 structure proteins with a size ranging from 21 to 120 kDa.

บทนำ

นับแต่ปี พ.ศ. 2520 เป็นต้นมา กรมประมงประสบความสำเร็จในการวิจัยการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวจนสามารถผลิตพันธุ์ปลาออกจำหน่ายแก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงทั้งในและต่างประเทศตลอดจนเป็นศูนย์กลางถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาดังกล่าวแก่เกษตรกร และผู้สนใจโดยทั่วไป (นิเวศน์ เรืองพานิช และเจนจิตต์ คงกำเนิด, 2535) แต่ในช่วง 5-7 ปีที่ผ่านมา อัตราการรอดตายของลูกปลาวัยอ่อนที่อนุบาลในโรงเพาะฟักลดต่ำลงและบ่อยครั้งที่มีการตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ในการอนุบาลแต่ละรุ่น ซึ่งสร้างความเสียหายแก่เกษตรกรเรื่อยมาโดยไม่ทราบสาเหตุ

นิเวศน์ เรืองพานิช และเจนจิต คงกำเนิด (2535) รายงานความผิดปกติของลูกปลากะพงขาวอายุ 15-22 วันว่า ในระหว่างการอนุบาลลูกปลามักเกิดอาการตัวผอม ไม่กินอาหาร ลอยตัวอยู่บริเวณผิวน้ำและตายเป็นจำนวนมากภายใน 3-4 วันหลังแสดงอาการดังกล่าว แต่จากการตรวจสอบสาเหตุของโรคเบื้องต้น (ปรสิตและแบคทีเรีย) ไม่พบสาเหตุการตายของลูกปลาดังกล่าว จากการติดตามเฝ้าสังเกตประมาณช่วงกลางปี พ.ศ. 2536-2537 พบว่าลูกปลากะพงขาวขนาด 1.0-1.5 เซนติเมตร อายุ 25-35 วัน ขณะอนุบาลในโรงเพาะฟักของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา มีอัตราการตายสูงถึง 80-95 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลาเริ่มแสดงอาการโดยกินอาหารลดลง ลำตัวลีบแบนและเปลี่ยนเป็นสีดำ ว่ายน้ำผิดปกติ มีอาการเกร็ง ชอบหลบแสงและซ่อนตัวรวมกันเป็นกลุ่มบริเวณมุมบ่อหรือที่มืด ก่อนจะลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำและตายในที่สุด โดยอัตราการตายจะเพิ่มสูงขึ้นและตายหมดภายใน 5-7 วันหลังจากแสดงอาการ ซึ่งใกล้เคียงกับที่ นิเวศน์ เรืองพานิช และเจนจิต คงกำเนิด (2535) รายงานไว้ เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์ (2539) ได้ทำการทดลองแยกเชื้อไวรัสจากลูกปลาดังกล่าวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงในเซลล์เนื้อเยื่อปลากะพงขาวและทดสอบการเกิดโรค จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าสาเหตุการตายของลูกปลากะพงขาวดังกล่าวเกิดจากเชื้อไวรัสครอบครัวอิริโดไวริดี (Iridoviridae) จึงตั้งชื่อไวรัสที่แยกได้ว่า "scabass iridovirus (SIV)"

การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อไวรัสด้วยเซลล์ SK ที่ผลิตได้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยด้านโรคสัตว์น้ำในอนาคต ตลอดจนนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของไวรัส SIV ที่แยกได้จากปลากะพงขาว
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของแถบโปรตีนของไวรัส SIV กับไวรัส GIV-1, GIV-2 ซึ่งแยกได้จากปลากะรัง และ TFIV ซึ่งแยกได้จากกบ

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ไวรัส

ไวรัสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อ SIV ที่แยกได้จากลูกปลากะพงขาวที่เป็นโรคในโรงเพาะฟัก สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา (เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์, 2539) ส่วนไวรัสที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางโปรตีนเป็นเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลากะรัง ได้แก่ เชื้อ grouper iridovirus-1 (GIV-1) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคครีบดำ (จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์, 2539) เชื้อ grouper iridovirus-2 (GIV-2) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแผลพุพอง (เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2540) และเชื้อ tiger frog iridovirus (TFIV) ซึ่งเป็นสาเหตุการป่วยเป็นแผลในกบ (สมเกียรติ์ กาญจนาคาร และคณะ, 2542)

เซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อไวรัส SIV คือ เซลล์จากส่วนไตปลากะพงขาว (SK) (เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2539) นอกจากนี้ยังใช้เซลล์ไลน์อีก 6 ชนิด ในการศึกษาการยอมรับเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลากะพงขาว ได้แก่ fathead minnow, *Pimephales promelas* (FHM) (Gravell and Malsberger, 1965), blue gill, *Lepomis macrochirus* fry (BF-2) (Wolf and Quimby, 1966), chanel catfish, *Ictalurus punctatus* ovary (CCO) (Bowser and Plumb,

1980), Epithelioma papulosum of cyprini (EPC) (Fijan, *et al.*, 1983), grouper, *Epinephelus malabaricus* fin (GF) (จิราพร เกษรจันทร์ และเรวัตร คงประดิษฐ์, 2537), gray mullet, *Liza subvidilis* fin (GMF) (เรวัตร คงประดิษฐ์ และคณะ, 2538)

สำหรับเซลล์ไลน์ EPC, FHM, CCO และ BF-2 เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM ผสมรวมกับซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ และแอลกลูตามีน (L-glutamine) 1 เปอร์เซ็นต์ในขณะที่เซลล์ไลน์ชนิดอื่นๆ ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ผสมรวมกับซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน อาหารเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดจะผสมด้วยยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินเข้มข้น 100 IUต่อมิลลิลิตร และสเตรพโตมัยซินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณของเชื้อไวรัส (titration of virus)

ปริมาณของเชื้อไวรัสหรือค่าไตเตอร์ ทดสอบโดยเตรียมเซลล์อายุ 24 ชั่วโมง ในถาดหลุมขนาดเล็ก (96 well plates) หยดสารละลายไวรัส ซึ่งถูกเจือจางครั้งละ 10 เท่าในสารละลาย HBSS ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ซ้ำ ในแต่ละระดับความเข้มข้น บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน คำนวณจากระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่เชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ($TCID_{50}$ /ml) (Rovozzo and Burke, 1973) ตามวิธีการของ Reed และ Muench (1938)

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อไวรัส

1. ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature)

ศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ในเซลล์ SK ซึ่งกำหนดค่า multiplicity of infection (MOI) = 0.1 ทิ้งให้เซลล์มีการดูดซึมสารละลายไวรัส 2 ชั่วโมง ล้างออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมีส่วนผสมของซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อฟลาสต์บ่มเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ในแต่ละวันเก็บ 1 ฟลาสต์ของแต่ละระดับอุณหภูมิ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บตัวอย่างครบ 7 วัน จึงนำมาตรวจเช็คค่าไตเตอร์ที่ได้ ตามวิธีการข้างต้น

2. ทดสอบชนิดของเซลล์ไลน์ต่อการยอมรับเชื้อและการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส (cell line susceptibility and virus replication)

ทำการศึกษาการยอมรับเชื้อไวรัส SIV โดยเลี้ยงเซลล์ไลน์ทั้ง 6 ชนิดในถาดหลุมขนาดเล็ก (96 well plate) หยดสารละลายไวรัส ซึ่งผ่านการเจือจางครั้งละ 10 เท่า ระดับความเข้มข้นละ 4 ซ้ำต่อเซลล์ไลน์ 1 ชนิด บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจเช็คค่าไตเตอร์ที่เชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายเซลล์ไลน์แต่ละชนิดได้

สำหรับการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์แต่ละชนิด ทำการศึกษาโดยเตรียมเซลล์ไลน์ทั้ง 6 ชนิดๆ ละ 7 ฟลาสต์ ซึ่งมีขนาดประมาณ 25 ตารางเซนติเมตร อายุ 24 ชั่วโมง ปลูกเลี้ยงเชื้อไวรัส SIV ในเซลล์ไลน์ทั้ง 6 ชนิด โดยคำนวณค่า MOI = 0.1 บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบค่าไตเตอร์ทุกวันๆ ละ 1 ฟลาสต์ต่อเซลล์ 1 ชนิด ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส จนครบ 7 วัน จึงนำตัวอย่างดังกล่าวมาละลาย เพื่อตรวจเช็คค่าไตเตอร์ที่ได้

3. กราฟการเจริญเติบโต (growth curve)

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ SIV ทำการศึกษาตามวิธีการของ McAllister และคณะ (1974) โดยทำการบ่มเลี้ยงเชื้อ SIV ในเซลล์ SK โดยคำนวณค่า MOI = 1.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทสารละลายไวรัสทิ้ง ล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ซึ่งผสมซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จึงนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 4 ฟลาสต์ (2 ซ้ำ) ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อตรวจนับปริมาณไวรัสอิสระและปริมาณไวรัสทั้งหมด โดยการศึกษาปริมาณไวรัสอิสระนำอาหารเลี้ยงเซลล์จากทั้ง 2 ฟลาสต์มารวมกันแล้วแยกตะกอนออกโดยการเหวี่ยงที่ความเร็ว 430 x g เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บสารละลายดังกล่าว ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนการเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้ายเสร็จสิ้น จึงตรวจเช็คค่าไตเตอร์ที่ได้ สำหรับการศึกษาปริมาณของไวรัสทั้งหมดจะรวบรวมทั้งเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์จากทั้ง 2 ฟลาสต์เข้าด้วยกันและแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาละลายอย่างรวดเร็วและตกตะกอนที่ความเร็ว 430 x g เป็นเวลา 15 นาที ตรวจเช็คค่าไตเตอร์ที่ได้

4. ความไวต่อสารคลอโรฟอร์ม (chloroform sensitivity)

ทดสอบปฏิกริยาของสารคลอโรฟอร์มต่อเชื้อ SIV ตามวิธีการของ Feldman และ Wang (1961) โดยการนำสารละลายไวรัสเข้มข้น 1 มิลลิลิตรผสมรวมกับสารคลอโรฟอร์ม 0.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่า 15 นาที จึงนำไปผ่านการเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 100 x g เป็นเวลา 10 นาที ทำการ

ตรวจเช็คค่าไตเตอร์ของสารละลายดังกล่าวเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ที่ไม่มีส่วนผสมของซีรัมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรแทน

5. ความคงทนต่อสารไอยูดีอาร์ (resistance to IUdR : 5-iododeoxyuridine)

ทดสอบผลของสารไอยูดีอาร์ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส ตามวิธีการของ Rovozzo and Burke (1973) โดยเลี้ยงเซลล์ SK ในถาดหลุมขนาดเล็ก หยดด้วยสารละลายไอยูดีอาร์ความเข้มข้น 10^{-4} โมลในสารละลาย HBSS และใช้ HBSS เป็นชุดควบคุม บ่มเลี้ยงร่วมกับสารละลายไวรัสที่ระดับความเข้มข้นเจือจางครั้งละ 10 เท่า นาน 3 ชั่วโมง เซลล์จะถูกล้างและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ซึ่งมีส่วนผสมซีรัม 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อหลุม บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน คำนวณค่าไตเตอร์ที่ได้

6. ชนิดของกรดนิวคลีอิกของไวรัส (viral nucleic acid)

ศึกษาชนิดของกรดนิวคลีอิก ตามวิธีการของ Rovozzo และ Burke (1973) โดยเพาะเลี้ยง SIV ในเซลล์ SK ที่ MOI = 1.0 ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรึง (fix) ด้วยสารคงสภาพคาร์นอยฟิกเซทีฟ (Carnoy's fixative) และย้อมด้วยสารละลายอาร์คริดีนออร์เรนจ์ (arcridine orange) ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายแมกอิลเวนน์บัฟเฟอร์ (McIlvaine's buffer) pH 3.8 นาน 5 นาที ล้างออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ก่อนเตรียมสไลด์และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

7. ความคงทนที่ระดับ pH ต่ำ (stability to low pH)

บ่มเลี้ยงไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ซึ่งมีค่า pH ต่างกัน คือ pH 3 และ 7 เป็นเวลานาน 30 และ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำสารละสายแต่ละชุดมาตรวจเช็คค่าไตเตอร์ โดยสารละลายซึ่งมีระดับ pH 3 จะปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอมอล ก่อนนำมาตรวจเช็คค่าไตเตอร์

8. ผลของความร้อนต่อการยับยั้งเชื้อไวรัส (heat inactivation)

ศึกษาผลของความร้อนในการยับยั้งเชื้อไวรัสตามวิธีการของ Rovozzo และ Burke (1973) เตรียมสารละลายไวรัสและทดสอบค่าไตเตอร์ ก่อนแบ่งใส่หลอดทดลองขนาดเล็กปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรจำนวน 6 หลอด แช่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ระดับอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ปรับระดับอุณหภูมิเป็นระดับปกติทันทีเมื่อครบเวลาที่กำหนด ก่อนตรวจเช็คค่าไตเตอร์ในแต่ละชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

9. ความคงทนต่อการแช่แข็ง-หลอมละลาย (stability to freeze-thaw)

ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อ SIV ในเซลล์ SK เมื่อพบการเข้าทำลายเซลล์สมบูรณ์นำสารละลายดังกล่าวตรวจเช็คค่าไตเตอร์ ก่อนเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลอมละลายสารละลายอย่างรวดเร็วในน้ำอุ่น แบ่งสารละลายส่วนหนึ่งเพื่อตรวจเช็คค่าไตเตอร์ ส่วนที่เหลือนำกลับไปแช่แข็ง ทำซ้ำเช่นเดิมอีก 3 ครั้ง เพื่อเปรียบเทียบสภาพความคงทนของเชื้อไวรัสต่อการแช่แข็งและหลอมละลาย

10. การศึกษาด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscopy)

เพิ่มจำนวนเชื้อ SIV ในเซลล์ SK ที่ MOI = 1.0 ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง จึงล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง แล้วตรึงตัวอย่างด้วยสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมในสารละลายโซเดียมคาโคไดเลตบัฟเฟอร์ (sodium cacodylate buffer) pH 7.4 ความเข้มข้น 0.1 โมล เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ล้างและตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 x g นาน 10 นาที ตรึงซ้ำอีกครั้งด้วยสารออสเมียมเตตระออกไซด์ (OsO_4) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนดึงน้ำออก (dehydrate) แล้วฝังในเรซินสังเคราะห์ (Epon-812) ตัดให้มีความหนา 50-80 นาโนเมตร แล้วย้อมด้วยสารยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) และสารเลดซิเตรท (lead citrate) ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Joel, JEM 100 CXII) ที่กำลังเร่ง 80 กิโลโวลท์ (kv)

11. การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ (virus purification)

เพิ่มจำนวนเชื้อ SIV โดยใช้เซลล์ SK ในฟลาสต์ขนาด 260 ตารางเซนติเมตร จำนวน 40 ฟลาสต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจพบการทำลายเซลล์จนหมดในแต่ละฟลาสต์ แช่แข็งที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เมื่อครบทั้ง 40 ฟลาสต์ นำมาหลอมละลายและแยกเศษเซลล์โดยตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตกตะกอนอนุภาคไวรัสอีกครั้งที่ความเร็ว 90,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 35 นาที ละลายด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (tris-HCl buffer) ความเข้มข้น 0.01 M pH 7.5 ก่อนนำมาผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ในสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่อง (continuous sucrose gradients) ความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ความเร็ว 90,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที (Hedrick *et al.*, 1992) แยกแถบอนุภาคไวรัสที่ได้ ล้างด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ (tris-HCl buffer) 2 ครั้ง ก่อนละลายอนุภาคไวรัสที่ได้ด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยสารละลายไวรัสส่วนหนึ่งจะถูกแบ่งออกเพื่อเตรียมตัวอย่างบน

แผ่นตะแกรงตัวอย่าง (grid) ชนิดเคลือบสำเร็จด้วยแผ่นฟิมล์พิเศษของสารฟอร์มวาร์ (formvar) และคาร์บอน (carbon) แล้วจึงนำมาย้อมด้วยสารละลายยูรานิลอะซิเตดความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และตรวจลักษณะของอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Joel, JEM 100 CXII) ที่กำลังเร่ง 80 กิโลโวลท์ (kv)

12. การวิเคราะห์โครงสร้างทางโปรตีน (analysis of viral structural proteins)

ศึกษาลักษณะโครงสร้างแถบของโปรตีนของไวรัสตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยนำไวรัสบริสุทธิ์ จากข้อ 11. ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (2x sample buffer : 0.5 M tris-buffer pH 6.8, 10 % v/v glycerol , 10 % w/v SDS 0.2%, w/v 2-mercaptoethanol, 0.05% w/v bromphenol blue) อัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที โปรตีนที่ได้นำมาแยกด้วยชุดวิเคราะห์โปรตีน sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งชุดเจลส่วนต้น (stacking gel) มีความเข้มข้นของเนื้อเจล 4.75 เปอร์เซ็นต์ และเจลส่วนแยก (separating gel) มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วยสีย้อมโคมาสซีบลู (comassie blue R-250) วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของอนุภาคไวรัสจากแถบโปรตีนที่ได้ด้วยเครื่อง Image analyzer (Bio-rad) และโปรแกรม Bio-rad multi-analyst-/PC version 1.1

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัส SIV กับไวรัส GIV-1, GIV-2 และ TFIV ตามวิธีการข้างต้น

ผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อไวรัส

1. ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม

เชื้อ SIV สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 13) และยังพบว่าที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไวรัสมีการเข้าทำลายเซลล์ช้าลงกว่าที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยสังเกตจากการเกิด CPE และค่าไตเตอร์ที่ได้

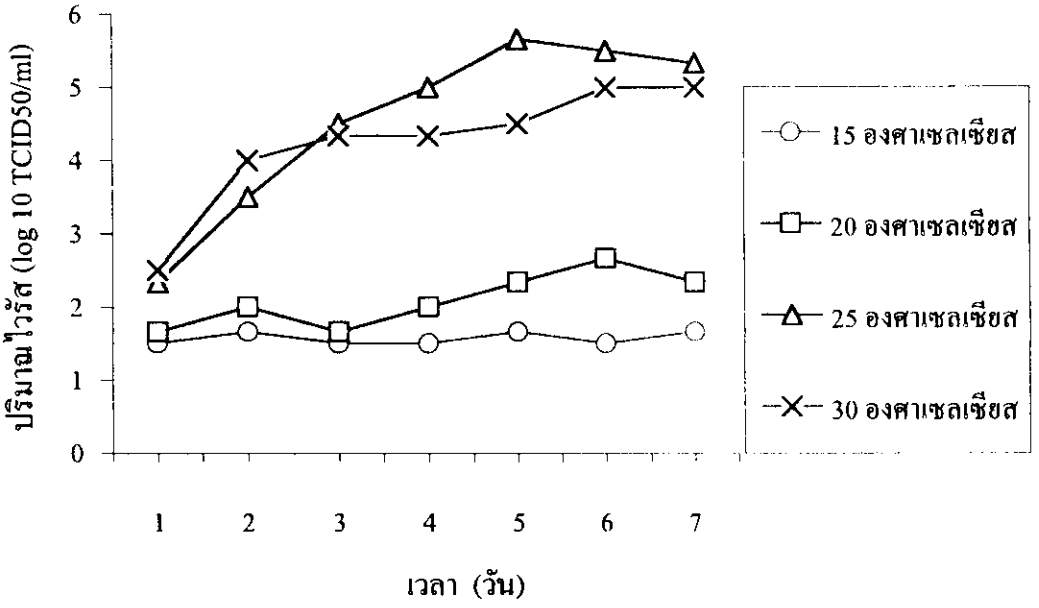
2. ชนิดของเซลล์ไลน์ต่อการยอมรับเชื้อและการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส

การทดสอบการยอมรับเชื้อ SIV ของเซลล์ไลน์ 7 ชนิด พบว่ามีเพียงเซลล์ SK เท่านั้นที่สามารถยอมรับเชื้อไวรัสได้ โดยสามารถตรวจพบ CPE ในวันที่ 3 ภายหลังการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน สามารถให้ค่าไตเตอร์ $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร

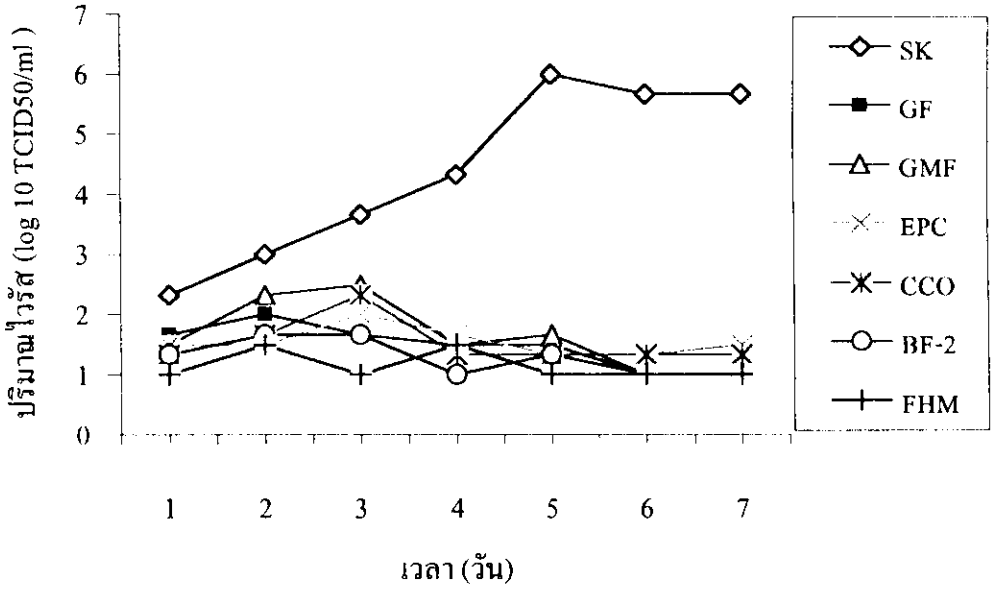
เช่นเดียวกับการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์ SK ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัสมีปริมาณสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 พร้อมกับการตรวจพบการเกิด CPE และให้ค่าไตเตอร์ $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร ในวันที่ 5 ก่อนมีค่าลดลงเท่ากับ $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร ในวันที่ 7 ขณะที่ไม่พบการเกิด CPE ในเซลล์ไลน์ชนิดอื่นๆ ตลอดการทดลอง 7 วัน และเมื่อทำการตรวจวัดค่าไตเตอร์พบว่า ในเซลล์ GMF, EPC และ CCO มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 3 ก่อนมีค่าลดต่ำลงจนไม่สามารถคำนวณค่าได้ในวันที่ 6 และ 7 (รูปที่ 14)

3. กราฟการเจริญเติบโต

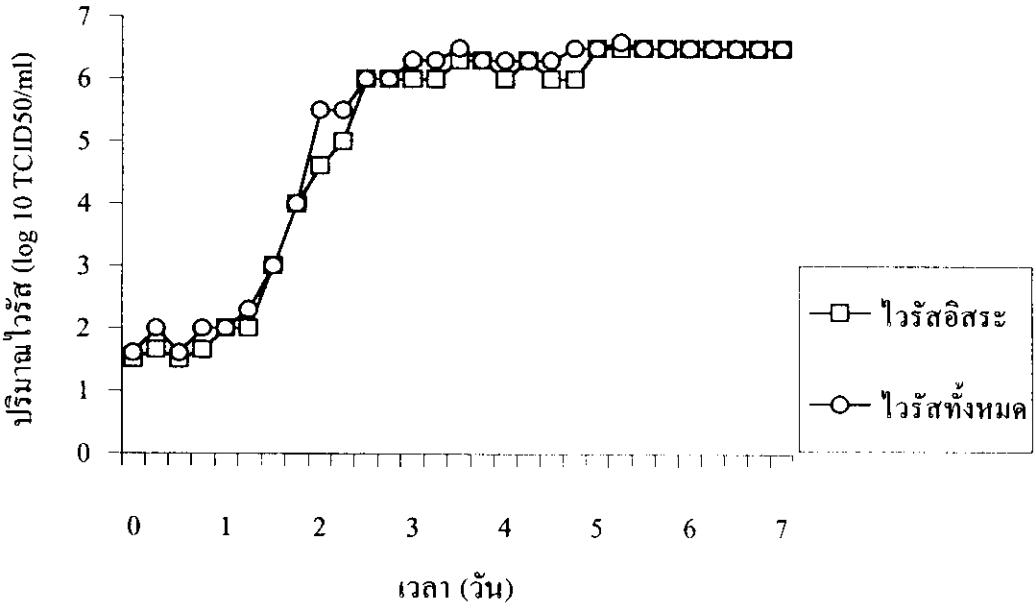
ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณไวรัสอิสระและปริมาณไวรัสทั้งหมดมีปริมาณค่อนข้างต่ำ แต่กลับเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 หรือในระหว่างชั่วโมงที่ 30-48 ก่อนจะมีค่าค่อนข้างคงที่ภายหลัง 72 ชั่วโมง โดยปริมาณไวรัสทั้งหมดและปริมาณไวรัสอิสระมีค่าสูงสุดประมาณ $10^{6.5}$ และ$10^{6.33}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตรตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 90 (รูปที่ 15)



รูปที่ 13 ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของไวรัส SIV ในเซลล์ SK (MOI = 0.1)



รูปที่ 14 การเพิ่มจำนวนของไวรัส SIV ในเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (MOI = 0.1)



รูปที่ 15 การเจริญเติบโต (growth curve) ของไวรัส SIV ในเซลล์ SK ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (MOI = 1.0)

4. ความไวต่อสารคลอโรฟอร์ม

ผลการทดสอบไม่พบการทำลายเซลล์ของไวรัส SIV ภายหลังทำปฏิกริยากับสารคลอโรฟอร์ม ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งผสมรวมกับอาหารสังเคราะห์ L-15 สามารถตรวจพบการทำลายเซลล์ของไวรัสมีค่าไตเตอร์เท่ากับ $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร (ตารางที่ 11) แสดงให้เห็นว่าผนังหุ้มอนุภาคไวรัสเป็นกลุ่มสารประกอบไขมัน

5. ความคงทนต่อสารไอยูดีอาร์

ผลการทดสอบพบว่าไวรัส SIV ถูกยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมโดยสารไอยูดีอาร์ ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ DNA (DNA inhibitor) จึงไม่สามารถทำลายเซลล์ SK ในชุดทดลองได้ ขณะที่ชุดควบคุมซึ่งมีสาร HBSS เพียงอย่างเดียว สามารถตรวจพบการทำลายเซลล์ของไวรัส มีค่าไตเตอร์เท่ากับ $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร (ตารางที่ 11) แสดงให้เห็นว่าไวรัส SIV มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA

6. ชนิดของกรดนิวคลีอิกของไวรัส

จากการตรวจสอบตัวอย่างเซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงไวรัส SIV มาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธีการย้อมด้วยสารเรืองแสงอาร์ดีเอ็นเอยเรนจ์และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ พบบักษณะของอินคลูชันบอดี (inclusion body) มีสีเขียวอ่อน ในส่วนของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ SK (รูปที่ 16) แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีการเพิ่มจำนวนในส่วนของไซโตพลาสซึมและมีกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอนเอสายคู่ (double-stranded DNA)

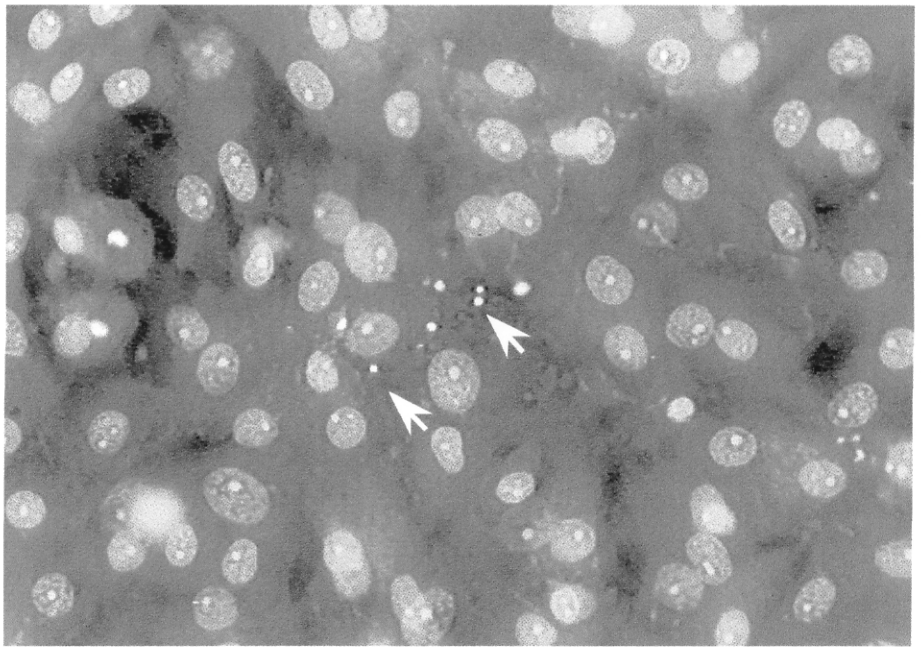
7. ความคงทนที่ระดับ pH ต่ำ

ผลการทดลองบ่มเลี้ยงไวรัส SIV ในอาหารสังเคราะห์ L-15 ที่ pH 3.0 เป็นเวลานาน 30 นาที พบว่าไวรัสถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ กล่าวคือไม่พบการทำลายเซลล์ของไวรัสในชุดการทดลองดังกล่าว เช่นเดียวกับชุดการทดลองบ่มเลี้ยงเป็นเวลานาน 60 นาที ในขณะที่ชุดควบคุม ซึ่งกำหนดให้ค่า pH เท่ากับ 7.0 มีค่าไตเตอร์ ภายหลังการบ่มเลี้ยงนาน 30 และ 60 นาที เท่ากับ $10^{5.33}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตรและ $10^{4.66}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 11) แสดงให้เห็นว่าไวรัส SIV ไม่สามารถคงทนที่ระดับ pH 3 เป็นเวลา 30 นาทีได้

ตารางที่ 11 คุณสมบัติทางชีวภาพและชีวเคมีบางประการของไวรัส SIV

Treatment		Titer of virus (log $TCID_{50}$/ml)	
		Treated	Control
Chloroform		< 2.0	5.66
IUdR (10^{-4} M)		< 2.0	5.66
pH 3.0	30 mins	< 2.0	5.33 *
	60 mins	< 2.0	4.66 *
Heat (56°C)	0 hr	5.33	-
	0.5 hr	< 2.0	-
	1.0 hr	< 2.0	-
	2.0 hrs	< 2.0	-
	4.0 hrs	< 2.0	-
	6.0 hrs	< 2.0	-
	8.0 hrs	< 2.0	-

* pH 7.0



รูปที่ 16 ลักษณะอินคลูชันบอดี (inclusion bodies) (ลูกศรชี้) ซึ่งติดสีเขียวอ่อนบริเวณไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ SK เมื่อตรวจดูกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Acridine orange stain : 1,680 X)

8. ผลของความร้อนต่อการยับยั้งเชื้อไวรัส

การทดสอบผลของความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสต่อการยับยั้งไวรัส SIV พบว่าไวรัส SIV ซึ่งมีค่าไตเตอร์ก่อนการทดลองเท่ากับ $10^{5.33}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ กล่าวคือไม่พบการถูกทำลายของเซลล์ เมื่อบ่มเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าไวรัสไม่สามารถทนต่อระดับอุณหภูมิสูงได้

9. ความคงทนต่อการแช่แข็ง-หลอมละลาย

ผลการทดสอบพบว่าค่าไตเตอร์ของไวรัสเริ่มต้นเท่ากับ $10^{5.66}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร จะมีค่าลดต่ำลง เมื่อทำการแช่แข็งและหลอมละลายในแต่ละครั้ง กล่าวคือมีค่าเท่ากับ $10^{5.33}$, $10^{5.0}$, $10^{4.66}$ และ $10^{4.33}$ $TCID_{50}$/มิลลิลิตร ในการแช่แข็งและหลอมละลายครั้งที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ (รูปที่ 17)

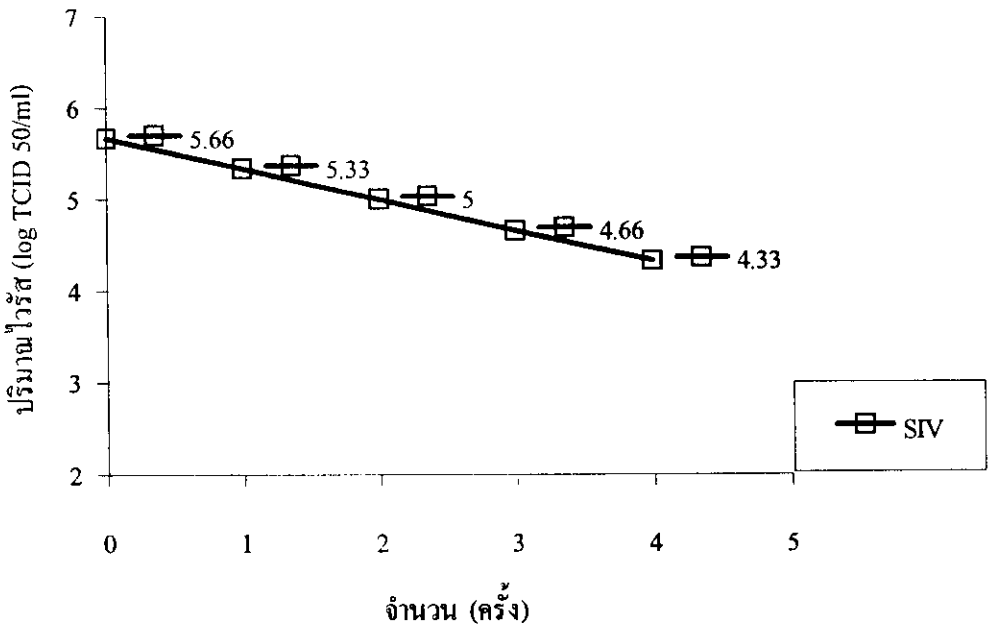
10. การศึกษาด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การทดลองเพาะเลี้ยงไวรัส SIV ในเซลล์ SK เพื่อการศึกษารูปร่างลักษณะและขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบอนุภาคไวรัสลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยม (icosahedral) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ nucleocapsid ประมาณ 140-160 นาโนเมตร (รูปที่ 18) ในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ SK และพบว่ามีการสร้างส่วนของผนังหุ้ม (envelope) โดยแทรกตัวผ่านพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเซลล์เจ้าบ้าน (รูปที่ 19) ซึ่งขนาดของอนุภาคสมบูรณ์มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200-220 นาโนเมตร

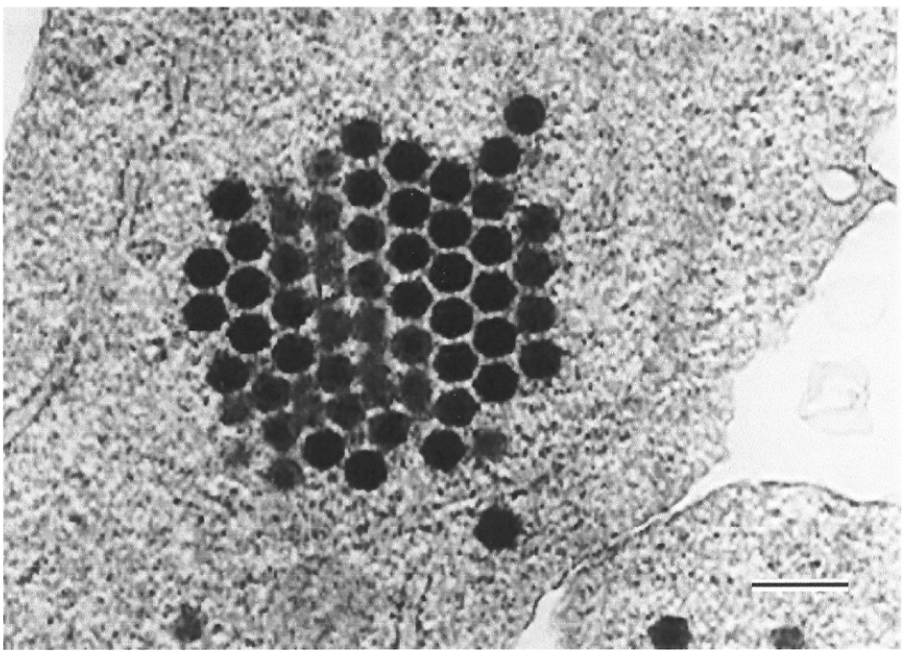
11. การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์

สามารถทำการแยกเชื้อไวรัส SIV บริสุทธิ์ โดยวิธีการแยกในสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่อง (continuous sucrose gradients) ความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ความเร็ว 90,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (รูปที่ 20)

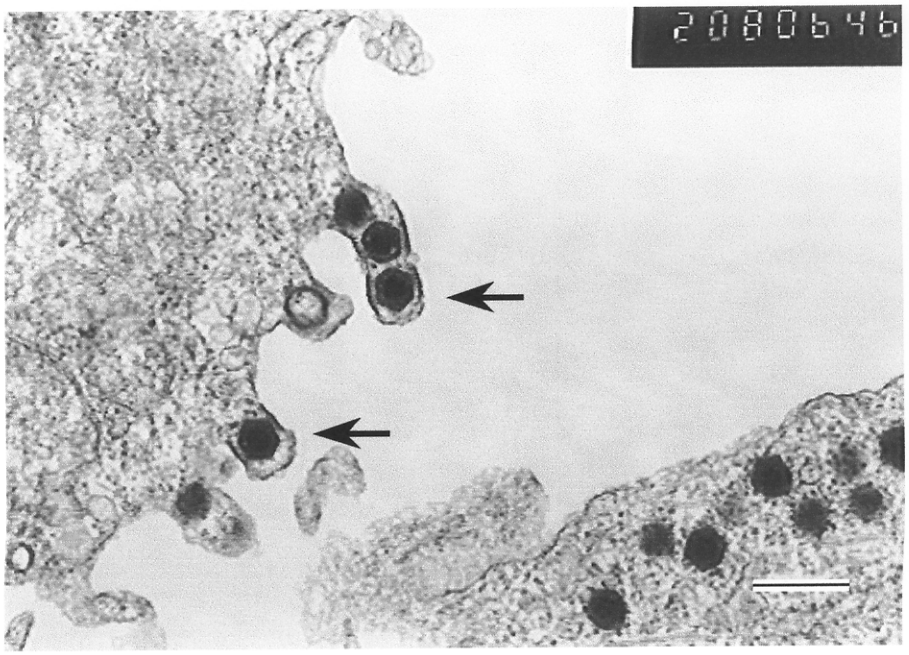
เมื่อนำสารละลายไวรัสดังกล่าวมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบอนุภาคไวรัส ซึ่งมีลักษณะและขนาดเช่นเดียวกับที่ตรวจพบในตัวอย่างปลากะพงขาวที่เกิดโรคและในเซลล์ SK ดังแสดงในรูปที่ 21



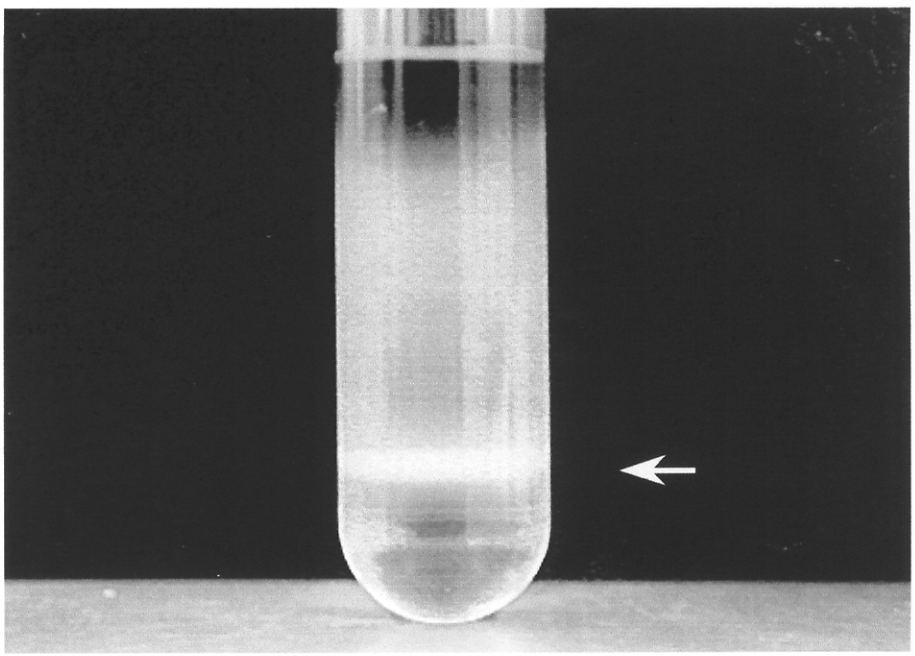
รูปที่ 17 สภาพความคงทนของไวรัส SIV ต่อการแช่แข็ง (-80 องศาเซลเซียส) และการหลอมละลาย ซึ่งมีผลทำให้อัตรารอดของไวรัสลดต่ำลง



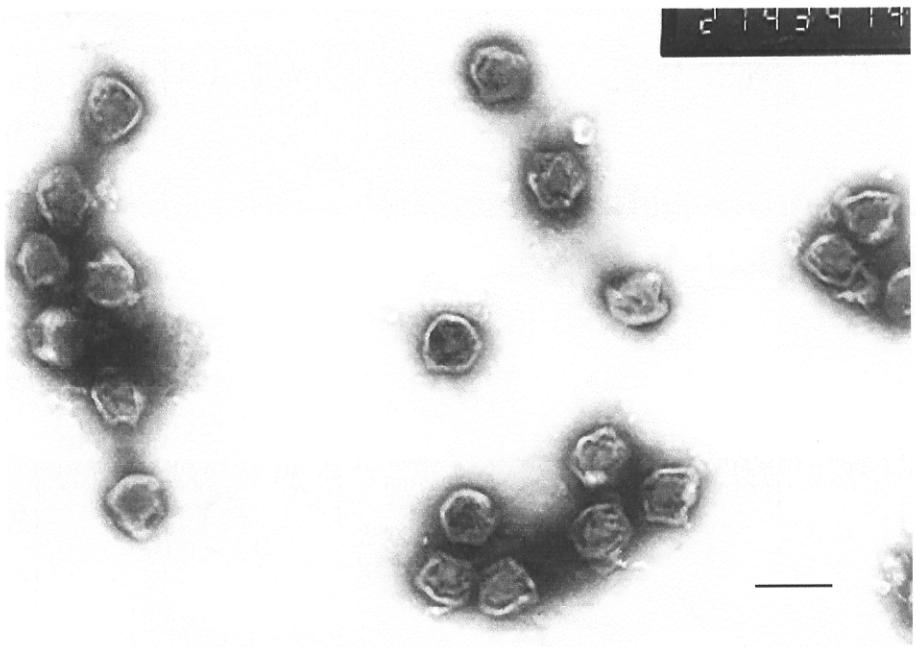
รูปที่ 18 อนุภาคไวรัส SIV มีรูปร่างแบบหลายเหลี่ยม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ประมาณ 140-160 นาโนเมตร ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์ SK (Uranyl acetate & Lead citrate ; Bar = 320 นาโนเมตร)



รูปที่ 19 ไวรัสสร้างผนังหุ้ม (envelope) โดยแทรกตัวผ่านพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของเซลล์ SK (ลูกศรชี้) ซึ่งจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่สมบูรณ์ประมาณ 200-220 นาโนเมตร (Uranyl acetate & Lead citrate ; Bar = 350 นาโนเมตร)



รูปที่ 20 แถบอนุภาคไวรัส (ลูกศรชี้) ที่แยกด้วยสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่องความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ ความเร็ว 90,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที

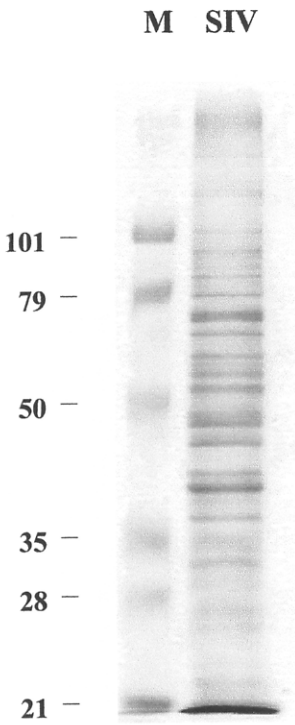


รูปที่ 21 ลักษณะของอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์ ภายหลังการแยกด้วยสารละลายซูโครสแบบต่อเนื่อง ความเข้มข้น 10-60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Uranyl acetate ; Bar = 250 นาโนเมตร)

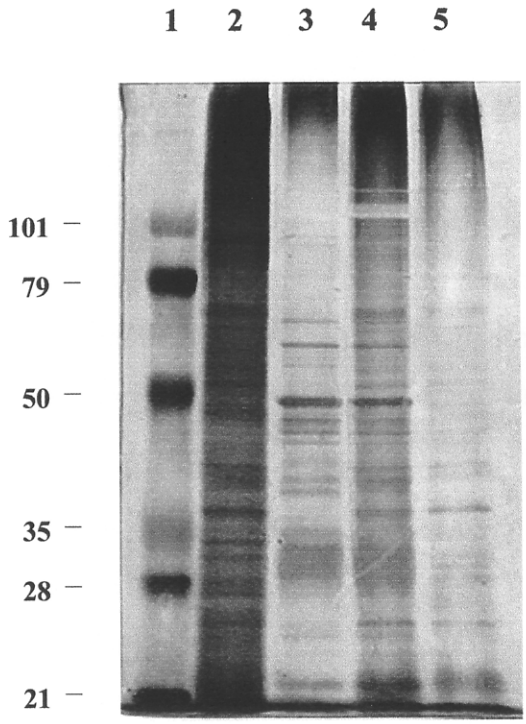
12. การวิเคราะห์โครงสร้างทางโปรตีน

เมื่อนำอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์มาทำการศึกษาโครงสร้างของโปรตีน โดยวิธีการแยกด้วยชุดวิเคราะห์โปรตีนแบบ SDS-PAGE ซึ่งมีความเข้มข้นของเนื้อเจลประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และย้อมด้วยสีโคมาสซีบลู (comassie blue R-250) พบว่าไวรัส SIV มีโครงสร้างของแถบโปรตีนประมาณ 27 แถบ (รูปที่ 22) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนตั้งแต่ 21-120 kDa โดยมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนรวมประมาณ 1,700 kDa และมีแถบโครงสร้างโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 32, 38, 40, 45, 49, 54, 59, 62, 65 และ 70 kDa เป็นองค์ประกอบหลัก

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลและลักษณะโครงสร้างโปรตีนของไวรัส SIV กับไวรัส GIV-1, GIV-2 และ TFIV พบว่าไวรัสทั้ง 4 ชนิดมีรูปแบบของโครงสร้างโปรตีนที่คล้ายคลึงกันแต่ไวรัส SIV, GIV-1 และ GIV-2 ซึ่งแยกได้จากปลา มีแถบโครงสร้างโปรตีนมากกว่าไวรัส TFIV ซึ่งแยกได้จากกบ กล่าวคือ 27, 23, 27 และ 19 แถบตามลำดับ ในขณะที่น้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของไวรัสทั้ง 4 ชนิดเท่ากับ 1,700, 1,298, 1,524 และ 976 kDa ตามลำดับ (รูปที่ 23)



รูปที่ 22 ลักษณะแถบโครงสร้างโปรตีนของไวรัส SIV เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตราฐาน (marker protein) (Bio-rad) ซึ่งประกอบด้วย phosphorylase B (101,000), bovine serum albumine (79,000), ovalbumin (50,100), carbonic anhydrase (34,700), soybean trypsin inhibitor (28,400) และ lysozyme (20,800) ตามลำดับ (Comassie blue R-250 stain)



รูปที่ 23 เปรียบเทียบลักษณะแถบโครงสร้างโปรตีนของไวรัส SIV กับแถบโครงสร้างโปรตีนไวรัสที่แยกได้จากปลาและกบ (Silver stain)

แถวที่ 1 แถบโปรตีนมาตรฐาน (marker protein) (Bio-rad)

แถวที่ 2 SIV

แถวที่ 3 GIV-1

แถวที่ 4 GIV-2

แถวที่ 5 TFIV

วิจารณ์และสรุป

การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อไวรัส SIV พบว่าไวรัสมีรูปร่างลักษณะแบบหลายเหลี่ยม มีขนาดของนิวคลีโอแคปซิดประมาณ 140-160 นาโนเมตร และขนาดอนุภาคที่สมบูรณ์ประมาณ 200-220 นาโนเมตร มีกรดนิวคลีอิกชนิด double stranded DNA สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์ SK ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีการเพิ่มจำนวนในส่วนของไซโตพลาสซึม ก่อนแทรกตัวผ่านผนังเซลล์ SK เพื่อสร้างเป็นผนังหุ้มส่วนของนิวคลิโอแคปซิดอีกชั้นหนึ่ง จึงมีความไวหรือถูกทำลายได้ด้วยสารคลอโรฟอร์ม นอกจากนี้อนุภาคไวรัสยังไม่คงทนในสภาพอุณหภูมิสูงหรือสภาพความเป็นกรด-ด่างต่ำ กล่าวคือจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ระดับอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส หรือที่ pH 3 เป็นเวลา 30 นาที ด้วยคุณสมบัติเบื้องต้นดังกล่าวจึงสามารถจัดจำแนกไวรัส SIV ไว้ในครอบครัว Iridoviridae ตามหลักอนุกรมวิธานของ Murphy และคณะ (1995)

ผลการศึกษาชนิดของเซลล์ต่อการยอมรับเชื้อไวรัส SIV แสดงให้เห็นถึงความเฉพาะเจาะจง (specific) ของเชื้อไวรัสต่อชนิดของเซลล์สัตว์น้ำ ซึ่งพบว่ามีเพียงเซลล์ SK ที่ผลิตได้ในครั้งนี้เท่านั้นที่สามารถยอมรับและใช้ในการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ นับเป็นสิ่งที่สามารถยืนยันความสำเร็จของการผลิตเซลล์จากปลากะพงขาว เพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษาเชื้อไวรัสได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับที่ Hedrick และคณะ (1991) ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตเซลล์ 2 ชนิดจากปลา white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) เพื่อใช้ในการศึกษาเชื้ออิริโดไวรัสที่ระบาดในปลา white sturgeon (Hedrick *et al.*, 1990) มาแล้ว นอกจากนี้การศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส แสดงให้เห็นว่าไวรัส SIV สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับไวรัส red sea bream iridovirus (RSIV) ที่มีการระบาดในประเทศญี่ปุ่น (Nakajima and Sorimachi, 1994) การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น (30 องศาเซลเซียส) ถึงแม้ว่าการทดลองในครั้งนี้ไม่สามารถทดสอบยืนยันผลได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเซลล์ SK ไม่สามารถเจริญหรือทนต่อระดับอุณหภูมิที่สูงขึ้นได้ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของเชื้อไวรัสดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคได้ เช่นเดียวกับที่ Amend (1970) ประสบความสำเร็จในการควบคุมเชื้อ IHNV (infections hematopoietic necrosis virus) ซึ่งเป็นสาเหตุการตายของลูกปลาเทราท์โดยวิธีการเพิ่มอุณหภูมิน้ำที่ใช้ในการอนุบาลให้สูงขึ้นมาแล้ว

สำหรับประเทศไทยพบรายงานการระบาดของเชื้ออิริโดไวรัสในปลาทะเลเศรษฐกิจแล้ว 2 ชนิดคือ ปลากะรังและปลากะพงขาว โดยสามารถทำการแยกเชื้อไวรัสได้แล้ว 3 ชนิด คือ ไวรัส SIV, GIV-1 และ GIV-2 ซึ่งจากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของโปรตีนพบว่าไวรัส SIV ประกอบด้วยโครงสร้างโปรตีน 27 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลของอนุภาคประมาณ 1,700 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับไวรัส GIV-1 และ GIV-2 ซึ่งมีแถบโครงสร้างโปรตีน 23 และ 27 แถบ และมีน้ำหนักโมเลกุลของอนุภาค 1,298 และ 1,524 kDa ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบโครงสร้างโปรตีนของไวรัสที่แยกได้จากปลาทะเลเศรษฐกิจทั้ง 3 ชนิดกับไวรัสที่แยกได้จากกบ (TFIV) ซึ่งจำแนกอยู่ในสกุลของ Ranavirus ครอบครัว Iridoviridae กลับพบว่าลักษณะโครงสร้างของโปรตีนส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องเช่นเดียวกับการศึกษาของ Hedrick และคณะ (1992) ซึ่งศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสครอบครัว Iridoviridae 3 ชนิดที่แยกได้จากปลาได้แก่ epizootic hematopoeitic necrosis virus (EHNV), sheatfish iridovirus-like agent และ catfish iridovirus มีลักษณะโครงสร้างของโปรตีนที่คล้ายคลึงกับไวรัสในสกุล Ranavirus (FV-3) มากและน่าจะจัดจำแนกเข้าเป็นสมาชิกของสกุล Ranavirus มากกว่ากลุ่มไวรัสซึ่งมีการแพร่ระบาดในปลาอีก 2 สกุลคือ Lymphocystisvirus และ Goldfish virus I (Murphy *et al.*, 1995) แต่อย่างไรก็ตามการจะจัดจำแนกไวรัส SIV เข้าเป็นสมาชิกของสกุลใดในครอบครัว Iridoviridae นั้นยังมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบในรายละเอียดอื่นๆ เช่น ลำดับเบส ซึ่งอาศัยปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction : PCR) หรือ ปฏิกริยาการรวมตัวกับแอนติบอดี เช่น ปฏิกริยาลบล้างฤทธิ์ (neutralization) หรือวิธีการติดฉลากแอนติบอดี (method with labelled antibody) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งที่น่าสนใจของไวรัสครอบครัว Iridoviridae คือสามารถแพร่กระจาย (transmision) ได้ทั้งแบบแนวดิ่งและแนวนอน (Murphy *et al.*, 1995) ดังนั้นการเกิดโรคในลูกปลากะพงขาวอาจจะได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสมาจากพ่อแม่พันธุ์ แต่ในช่วงวัยอ่อนการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันโรคต่ำ ประกอบกับสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ระดับอุณหภูมิน้ำต่ำ จึงทำให้พบการเกิดโรคได้ง่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาขนาดใหญ่ (เรวัตร คงประดิษฐ์ และจิราพร เกษรจันทร์, 2539) ซึ่งมีระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับการพัฒนาสูงขึ้น จึงสามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของเชื้อได้ในสภาวะปกติ ดังนั้นมาตราการควบคุมป้องกันการระบาดของโรคประการหนึ่งคือการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อสำหรับใช้ในการเพาะและขยายพันธุ์ เพื่อป้องกันการติดเชื้อ ดังนั้นเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและเหมาะสมจึงควรถูกพัฒนาขึ้นเพื่อรองรับงานด้านนี้ต่อไป