รายงานการวิจัย

เรื่อง

การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพาหะนำเชื้อและสิ่งมีชีวิตธรรมชาติโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

DNA detection in suspected carriers of virus (SEMBV) by PCR (Polymerase Chain Reaction)

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.กิจการ ศุภมาตย์

ผู้ร่วมวิจัย นางสาวจรีพร เรืองศรี

สมอ

QR201.V55

ก62

2542

าพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

ยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวขาวจากพาหะนำเชื้อและสิ่งมีชีวิตธรรมชาติโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

จรีพร เรืองศรี [1] และ กิจการ ศุภมาตย์ [2]

Abstract

Ruangsri, J[1]. and Supamattaya, K[2].

DNA detection in suspected carriers of virus (SEMBV) by PCR (Polymerase Chain Reaction)

DNA fragments of white spot virus (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus: SEMBV) were detected in various natural aquatic organisms by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The suspected carriers (shrimps, crabs, fish, benthic organisms and planktons) were collected from the sources near shrimp farms (Gulf of Thailand and Andaman Sea) from October 1997 to September 1998. First step amplification of the DNA extracted from samples consistently yielded 643 basepairs PCR product as expected. Second step amplification PCR product containing SEMBV DNA yielded an expected 330 basepairs. Specific DNA fragments of SEMBV were detected in 6 species of wild shrimp (krill *Acetes sp.* and *Euphausia sp.*, snapping shrimp *Alpleus euphrosyne*, banana shrimp *Penaeus merguiensis*, speckled shrimp *Metapenaeus monoceros* and dwarf prawn *Macrobrachium equideus*). It was also detected in 2 species of wild crab (merder's mangrove crab *Sesarma merderi* and hermit crab *Eupagurus bernberdus*) and 3 species of fish (mud skipper *Periophthalmus sp.*, goby fish *Gnathogobius aliceae* and blue panchax *Aplocheilus panchax*). Gastropod (Family Cerithidae), benthic polychaete and planktons (copepods, rotifers, moinas, nauplius and oscillatoria) were also detected for the SEMBV DNA fragments. These aquatic organisms were found to be reservoir hosts of SEMBV. Using both techniques demonstrated that the virus was found in carriers similar to SEMBV in the cultured shrimp *Penaeus monodon* with white spot syndrome. The prevalence of SEMBV in different carriers in relation to seasonal cycle and localities is discussed in this paper.

Key words: Detection of viral DNA, SEMBV, *Penaeus monodon*, virus carrier, PCR

---

[1] and [2] Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

[1]วท.บ. วาริชศาสตร์ นักวิชาการประมง ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 [2]Ph.D. Biology (Aquatic Animal Disease) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Bib Key 208066

20 มี.ค. 2544

หอสมุด คุณหญิง หลง อรรถสุวิณณ์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับแล้ว
๐. กิจการ ศุภมาตย์
วันที่ 1 ๐ มี.ค. 2544

บทคัดย่อ

จรีพร เรืองศรี และ กิจการ ศุภมาตย์

การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพาหะนำเชื้อและสิ่งมีชีวิตธรรมชาติโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส

การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) จากพาหะนำเชื้อและสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ จำพวก กุ้ง หอย ปู ปลา เพรียง สัตว์หน้าดินและแพลงก์ตอน ในช่วงเดือนตุลาคม 2540 ถึงกันยายน 2541 ที่เก็บจากชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกของภาคใต้ โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (PCR) 2 ขั้นตอน (step) ผลของ PCR ขั้นตอนแรกพบ DNA ขนาด 643 คู่เบส และ PCR ขั้นตอนสองพบ DNA ขนาด 330 คู่เบส ผลการศึกษาตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง 6 ชนิดคือ กุ้งเคย (*Acetes sp.*) และ (*Euphausia sp.*) กุ้งดีด (*Alpleus euphrosyne*) กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus monoceros*) และกุ้งกะต่อม (*Macrobrachium equideus*) ปู 2 ชนิดคือปูแสม (*Sesarma merderi*) และปูเสฉวน (*Eupagurus bemberdus*), ปลา 3 ชนิดคือ ปลาตีน (*Periophthalmus sp.*) ปลาบู่แคระ (*Gnathogobius aliceae*) และปลาหัวตะกั่ว (*Aplocheilus panchax*) หอยขี้นก (Family Cerithidae) เบนโตส (polychaete) และตรวจพบในตัวอย่างแพลงก์ตอนพวก copepods, rotifers, moinas, oscillatoria ตัวอ่อนของสัตว์น้ำบางชนิดรวมอยู่ด้วย แต่ไม่พบ DNA ดังกล่าวในเพรียงหิน ลักษณะทางพันธุกรรม (DNA) ที่เหมือนของไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ แสดงว่าเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ในกุ้งกุลาดำมีการแพร่กระจายในสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติหลาย ๆชนิดและสิ่งมีชีวิตดังกล่าวสามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมาติดต่อสู่กุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในฝั่งตะวันออกมีความถี่สูงกว่าในฝั่งตะวันตกและในฤดูร้อนสูงกว่าในฤดูฝน

การระบาดของโรคจุดขาวอย่างรุนแรงในกุ้งกุลาดำมีรายงานในประเทศไทยเมื่อปลายปี พ.ศ. 2537 (Kasornchandra *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995) โดยพบว่ากุ้งที่เป็นโรคจะปรากฏจุดขาวบริเวณเปลือก ระยางค์ และเปลือกลำตัว (Figure 1) จากการศึกษาวิจัยพบว่าโรคชนิดมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสชนิด non-occluded baculovirus ชื่อ SEMBV (Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus) (Wongteerasupaya *et al.*, 1995) ซึ่งมีอนุภาคของไวรัสที่เจริญเต็มที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120 นาโนเมตรและมีความยาวประมาณ 275±22 นาโนเมตร ในขณะที่นิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ของไวรัสชนิดนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 85 นาโนเมตรและมีความยาวประมาณ 236±13 นาโนเมตร (Figure 2) (Kasornchandra *et al.*, 1995) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะมีลักษณะบวมพองของเซลล์ผิวใต้เปลือก ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในการเข้าทำลายเซลล์ของไวรัสชนิดนี้ (Figure 3) (Kasornchandra and Boonyaratpalin, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Supamattaya and Boonyaratpalin, 1996) ไวรัส SEMBV พบการติดเชื้อในกุ้งหลายชนิดในหลายๆประเทศแถบเอเชีย (Nakano *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995; Nash, 1995; Kasornchandra and Boonyaratpalin, 1995; Inouye *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997) และจากการรายงานของ Wongteerasupaya *et al.* (1995); Lo *et al.* (1996); Lo *et al.* (1997) พบว่าสัตว์น้ำจำพวก

กุ้งทะเล ปูทะเล และอาร์โทรปอดหลายๆชนิดที่อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติสามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสชนิดนี้ติดต่อสู่กุ้งในบ่อเลี้ยงได้ เช่นเดียวกับรายงานของ Supamattaya *et al.* (1998) ที่ทดลองติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกุ้งและปูพบว่าสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวสามารถเป็นพาหะนำเชื้อติดต่อสู่กุ้งกุลาดำได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติและบริเวณฟาร์มเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้จึงใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิตที่กระจายอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำบริเวณฟาร์มเลี้ยงกุ้ง รวมทั้งศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่กระจายของเชื้อในแต่ละพื้นที่กับฤดูกาลต่างๆ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีความจำเป็นที่จะนำไปใช้เป็นแนวทางในการจัดการและควบคุมการแพร่กระจายของโรคไวรัสชนิดนี้ได้ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างทดลอง

เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่คาดว่าเป็นพาหะของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว(SEMBV) ซึ่งอยู่ในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ในเขตพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออก(อ่าวไทย) จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสงขลาและจังหวัดปัตตานี เขตพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตก (อันดามัน) จากจังหวัดสตูล จังหวัดตรังและจังหวัดกระบี่ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2540 ถึงเดือนกันยายน 2541 โดยในแต่ละพื้นที่ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กุ้ง ปู ปลา หอย เพรียง สัตว์หน้าดิน แพลงก์ตอนและเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นด่างและความเค็ม เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตกลุ่ม กุ้ง ปู ปลา หอย เพรียงหินและตัวอย่างน้ำ โดยการแช่ในน้ำแข็ง ส่วนตัวอย่างสัตว์หน้าดิน และแพลงก์ตอนเก็บดองในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ทำการเก็บสิ่งมีชีวิตทุกชนิดดองด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซนต์ เพื่อการจำแนกชนิด ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดนำเข้าสู่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ เพื่อวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

นำตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่รวบรวมได้แต่ละชนิดแยกใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ที่อบฆ่าเชื้อแล้วหลอดละ 60-100 มิลลิกรัมและทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Kasornchandra *et al.* (1997) โดยเติม DNA-zol (Gibco BRL, Grand Island, New York) หลอดละ 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที บดตัวอย่างให้ละเอียด นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสประมาณ 400 ไมโครลิตรใส่ในหลอดเซ็นติฟิวจ์หลอดใหม่ เติมแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซนต์ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 2-3 นาที สารละลายในหลอดจะแยกเป็น 2 ส่วนดูดสารละลายส่วน DNA-zol ทิ้งอย่างระมัดระวังนำสารละลายส่วนที่เหลือไปเซ็นตริฟิวจ์ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ ครั้งละ 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลาย

ตะกอนดังกล่าวด้วยน้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณเล็กน้อยแล้วเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี PCR

ตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยวิธี PCR โดยใช้ Primers ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ตามที่เคยรายงานไว้โดย Takahashi *et al.* (1996) เข้าตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส 2 คู่ คือ

First step PCR ใช้ primers P1 และ P4 เข้าจับดีเอ็นเอของไวรัสโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเป็นดีเอ็นเอต้นแบบและนำเข้าสู่กระบวนการตรวจวิเคราะห์ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Takahashi *et al.* (1996) โดยส่วนผสม PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 10X PCR buffer (Gibco BRL) $MgCl_2$ 50 mM (Gibco BRL) deoxynucleotide triphosphate 200 μM (Gibco BRL) primers P1 และ P4 ชนิดละ 1 μM และ DNA *Taq* polymerase 2.5 U (Gibco BRL) จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, M.J. Research) จากอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเข้าสู่โปรแกรมเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเริ่มจากอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที และทำซ้ำโปรแกรมเดิมอีก 29 รอบ แล้วเข้าสู่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาทีเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดสมบูรณ์และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงนำไปแยกหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสโดยอิเลคโทรโฟริซิสในอะกาโรส 0.8 เปอร์เซนต์ และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide, 0.05 mg/ml) ประมาณ 20 นาที ตรวจผลแถบดีเอ็นเอของไวรัสด้วยเครื่อง visualizer (TFX-20M, France) จะเห็นแถบดีเอ็นเอไวรัสสีส้มขนาด 643 คู่เบส

Second step PCR (inner primers) ตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสโดยใช้ Primers P2 และ P3 และใช้ ดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก first step PCR และนำเข้าสู่กระบวนการตรวจวิเคราะห์และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แยกหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสด้วยวิธีเดียวกัน ได้ผลผลิต PCR ขนาด 330 คู่เบส

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter (Mettler Delta 340) ค่าความเค็ม (Salinity) ด้วยเครื่อง Salinometer (Atago S-28) และค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) ของน้ำ ตามวิธีการของ Boyd and Tucker (1992)

ภาวะการเกิดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ในกุ้งเลี้ยง

เก็บข้อมูลภาวะการเกิดโรคติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งเลี้ยงบริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่คาดว่าเป็นพาหะนำเชื้อโดยการเก็บข้อมูลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่เกษตรกรนำเข้ามาตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ และสอบถามข้อมูลจากเกษตรกรเกี่ยวกับ

พื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ความรุนแรงของโรคโดยข้อมูลจะรวบรวมทั้งฝั่งทะเลตะวันออกและฝั่งทะเลตะวันตกช่วงเดือนตุลาคม 2540 ถึงกันยายน 2541

ผลการศึกษา

ผลการเก็บตัวอย่างทดลอง

ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2540 ถึงเดือน กันยายน 2541เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่สงสัยและสันนิษฐานว่าอาจจะเป็นพาหะของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ซึ่งอยู่ในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งหมด 217 ตัวอย่าง ในกลุ่มต่างๆ คือกุ้งธรรมชาติได้แก่กุ้งเคย (*Acetes sp.* และ *Euphausia sp.*) กุ้งดีดขัน (*Alpleus euphrosyne*) กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus monoceros*) กุ้งกะต่อม (*Macrobrachium equideus*) ปูชนิดต่างๆคือ ปูแสม (*Sesarma mederi Metaplex sp.* และ *Sarmatium germaini*) ปูก้ามดาบ (*Uca sp.*) ปูเสฉวน (*Eupagurus bernberdus*) ปลาตีน (*Periophthalmus* sp.) ปลาบู่แคระ (*Gnathogobius aliceae*) ปลาหัวตะกั่ว (*Aplocheilus panchax*) หอยขี้นก (Family Cerithidae) เพรียงหิน (Barnacle) สัตว์หน้าดินในกลุ่มโพลิคีต (Polychaete) และตัวอย่างแพลงก์ตอนพืชและสัตว์โดยมีแพลงก์ตอนสำคัญ ๆ คือ copepods, rotifers, nauplius, moinas และ oscillatoria รวมๆ กัน

ผลการตรวจหาไวรัส SEMBV ในตัวอย่าง

ในการศึกษาครั้งนี้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง 6 ชนิดคือ กุ้งเคย (*Acetes sp.* และ *Euphausia sp.*) กุ้งดีด (*Alpleus euphrousyne*) กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus monoceros*) กุ้งกะต่อม (*Macrobrachium equideus*) ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ SEMBV ในปู 2 ชนิดคือปูแสม (*Sesarma mederi*) และปูเสฉวน (*Eupagurus bernberdus*) ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสในปลา 3 ชนิด คือ ปลาตีน (*Periophthalmus* sp.) ปลาบู่แคระ (*Gnathogobius aliceae*) ปลาหัวตะกั่ว (*Aplocheilus panchax*) นอกจากนั้นยังตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส SEMBV ในหอยขี้นก (Family Cerithidae) สัตว์หน้าดินในกลุ่มโพลิคีต (Polychaete) และในตัวอย่างแพลงก์ตอน แต่ไม่พบดีเอ็นเอของไวรัส SEMBV ในเพรียงหิน (Barnacle) โดยพบว่าจากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตทั้งหมด 217 ตัวอย่างตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัส SEMBV โดยใช้ first step PCR เพียง 1.84 เปอร์เซนต์ (4/217) และตรวจพบโดยใช้ second step PCR (inner primers) 33.64 เปอร์เซนต์ (73/217) และตรวจไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส SEMBV โดยผ่านทั้ง 2 step PCR 66.36 เปอร์เซนต์ (144/217) (Table 1) โดยพบว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างสัตว์ทดลองทั้งจาก first step PCR และ second step PCR มีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจจับดีเอ็นเอของไวรัส SEMBV ในกุ้งกุลาดำที่เกิดโรคตัวแดงดวงขาว (Figure 4)

การแพร่กระจายของเชื้อไวรัส SEMBV ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่าง ๆ

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่าง ๆ พบเชื้อไวรัส SEMBV ในกุ้งชนิดต่าง ๆ คิดเป็น 37.93 เปอร์เซนต์ (22/58) ตรวจพบในปู 25.71 เปอร์เซนต์ (9/35) ในปลา 67.74 เปอร์เซนต์ (21/31) หอย 54.17 เปอร์เซนต์ (13/24) โพลีคีต 8.70 เปอร์เซนต์ (2/23) และแพลงก์ตอน 25.0 เปอร์เซนต์ (6/24) (Table 2) และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การติดเชื้อไวรัส SEMBV ในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในธรรมชาติระหว่างกลุ่มอาร์โทรปอด (กุ้งและปู) และกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ (ปลา หอย โพลีคีต แพลงก์ตอน และเพรียงหิน) พบว่าตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัส SEMBV ในกลุ่มอาร์โทรปอด 33.33 เปอร์เซนต์ (31/93) และกลุ่มสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ รวม 33.87 เปอร์เซนต์ (42/124) (Table 3)

ผลการแพร่กระจายของ SEMBV ในพื้นที่ต่าง ๆ

จากการตรวจหาเชื้อไวรัส SEMBV ในสิ่งมีชีวิตที่กระจายอยู่ทั่ว ๆ ไปในธรรมชาติ พบว่ามีการกระจายของเชื้อ SEMBV ตามพื้นที่ต่างๆ ดังนี้คือฝั่งทะเลตะวันออก จังหวัดสงขลา - นครศรีธรรมราช 51.43 เปอร์เซนต์ (18/35) จังหวัดปัตตานี 25.64 เปอร์เซนต์ (10/39) และจังหวัดสุราษฎร์ธานี 41.67 เปอร์เซนต์ (15/36) ฝั่งทะเลตะวันตก จังหวัดสตูล 30.0 เปอร์เซนต์ (9/30) จังหวัดตรัง 30.56 เปอร์เซนต์ (11/36) และจังหวัดกระบี่ 24.39 เปอร์เซนต์ (10/41) โดยคิดการแพร่กระจายในพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกเป็น 39.09 เปอร์เซนต์ (43/110) และพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตก 28.04 เปอร์เซนต์ (30/107) (Table 4-5)

ผลการแพร่กระจายของไวรัส SEMBV ตามฤดูกาลและพื้นที่ต่างๆ

จากการใช้เทคนิค PCR ตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในธรรมชาติและบริเวณแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบการแพร่กระจายของไวรัส SEMBV ในช่วงฤดูร้อนของพื้นที่ชายฝั่งตะวันออก (ช่วงเดือนเมษายน-เดือนกันยายน) 42.62 เปอร์เซนต์ (26/61) แถบพื้นที่ชายฝั่งตะวันตก (ช่วงเดือนตุลาคม-มิถุนายน) 28.92 เปอร์เซนต์ (24/83) ในฤดูฝนพบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสแถบพื้นที่ชายฝั่งตะวันออก (ช่วงเดือนตุลาคม-มีนาคม) 34.69 เปอร์เซนต์ (17/49) แถบชายฝั่งตะวันตก (ช่วงเดือนกรกฎาคม-เดือนกันยายน) 25.0 เปอร์เซนต์ (6/24) เมื่อรวมการแพร่กระจายของเชื้อในพาหะธรรมชาติของทั้งสองเขตพื้นที่พบว่าเชื้อไวรัสชนิดนี้มีการแพร่กระจายในช่วงฤดูร้อนสูงกว่าฤดูฝน อย่างไรก็ตามฤดูร้อนแถบชายฝั่งทะเลตะวันตกของภาคใต้มีระยะเวลาที่ยาวนานกว่าช่วงฤดูฝนทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อในช่วงฤดูร้อนสูงกว่าฤดูฝน โดยในฤดูร้อนมีค่า 34.72 เปอร์เซนต์ (50/144) ในฤดูฝน 31.51 เปอร์เซนต์ (23/73) แต่ในขณะเดียวกันพบว่าในแถบพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกระยะเวลาในฤดูฝนยาวนานพอๆกันกับช่วงฤดูร้อน จึงส่งผลให้พบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในพาหะธรรมชาติในฤดูฝนสูงกว่าแถบพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตก นอกจากนี้ยังพบว่าการแพร่กระจายของเชื้อชนิดนี้ในพาหะธรรมชาติบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกสูงกว่าบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกอย่างชัดเจนทั้งสองฤดูกาล (Table 5)

ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเบื้องต้น

ผลของคุณภาพน้ำเบื้องต้นในแต่ละบริเวณและฤดูกาลที่ทำการเก็บตัวอย่างสัตว์ทดลอง พบว่าในช่วงฤดูร้อน ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าที่แตกต่างกันในช่วงกว้างโดยพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกมีค่า 7.38-8.09 พื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกมีค่า 7.26-8.21 ในขณะที่ฤดูฝนค่าความเป็นกรด-ด่าของน้ำแถบชายฝั่งทะเลตะวันออกแตกต่างกันอยู่ในช่วงแคบๆคือ 7.90-7.95 และพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกมีค่า 7.38 ในขณะเดียวกันพบว่าความเค็มของน้ำในช่วงฤดูร้อนมีค่าสูงกว่าฤดูฝน โดยในช่วงฤดูร้อนพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกน้ำมีความเค็มในช่วง 22.0-31.1 ส่วนในพันส่วน และพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกมีค่าอยู่ในช่วง 23.0-30.6 ส่วนในพันส่วน ในฤดูฝนพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกน้ำมีความเค็มในช่วง 16.5-18.5 ส่วนในพันส่วน ส่วนพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกความเค็มมีค่า 25.9 ส่วนในล้านส่วน ส่วนความเป็นด่าง (Alkalinity) ของน้ำทั้งสองเขตพื้นที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมและไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละฤดูกาล ดังแสดงใน Table 6

สภาวะการเกิดโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ในกุ้งเลี้ยง

จากข้อมูลการวิเคราะห์ตัวอย่างกุ้งกลาดำที่เกษตรกรนำเข้ามาตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ และสอบถามข้อมูลจากเกษตรกรช่วงเดือนตุลาคม 2540 ถึง ธันวาคม 2540 พบว่าโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวระบาดในกุ้งที่เลี้ยงในเขตพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกแถบอำเภอท่าฉาง จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี และระบาดบริเวณกว้างในอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช รวมทั้งอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา แต่พบว่าการระบาดของโรคยังอยู่ในระดับไม่รุนแรงมากนัก พื้นที่ชายฝั่งตะวันตกพบว่ามีการระบาดของโรคไม่มากในแถบพื้นที่อำเภอละงู อำเภอท่าแพ จังหวัดสตูล อำเภอย่านตาขาว จังหวัดตรัง และอำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่

ช่วงเดือนมกราคม 2541 ถึง มีนาคม 2541 พบว่ายังคงมีโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวระบาดในกุ้งเลี้ยง พื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกแถบอำเภอท่าฉาง จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอปากพยูน จังหวัดพัทลุง อำเภอระโนด อำเภอเทพา จังหวัดสงขลา ส่วนพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกพบการระบาดที่ อำเภอละงู จังหวัดสตูล อำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง และอำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่

ช่วงเดือนเมษายน 2541 ถึง มิถุนายน 2541 พบว่ามีโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวระบาดในกุ้งเลี้ยงพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกอย่างรุนแรงเป็นบริเวณกว้างแถบอำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา อำเภอยะหริ่ง อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ส่วนพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกพบมีการระบาดเล็กน้อยแถบจังหวัดสตูล และ จังหวัดตรัง

ช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน 2541 พบว่าเริ่มมีการระบาดของโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งที่เลี้ยงในเขตพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกบ้างแถบอำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี และอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ส่วนพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกพบมีการระบาดเล็กน้อยแถบอำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่

วิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (SEMBV) ที่เป็นสาเหตุของโรคจุดขาวที่ระบาดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทยในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติใกล้บ่อเลี้ยงกุ้งรวมทั้งในบ่อเลี้ยงกุ้งด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) พบว่าเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวมีการแพร่กระจายอยู่ในสัตว์น้ำจำพวกกุ้ง ปู และอาร์โทรปอดอื่นอีกหลายชนิดและสามารถเป็นพาหะหรือตัวนำเชื้อติดต่อสู่กุ้งกุลาดำได้ ซึ่งสัมพันธ์กับรายงานของ Lo *et al.* (1996) และ Lo *et al.* (1997) ที่พบ WSBV ในกุ้ง ปู และกลุ่มอาร์โทรปอดอื่นๆ หลายชนิดทั้งที่อยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้งบริเวณชายฝั่งของประเทศไต้หวันเป็นพาหะนำเชื้อติดต่อสู่กุ้งเลี้ยงได้ รวมทั้งรายงานของ Wongteerasupaya *et al.* (1995) พบว่าปูทะเลบางชนิดที่เกษตรกรนำมาใช้เป็นอาหารของแม่กุ้งก็เป็นพาหะนำเชื้อติดต่อสู่กุ้งเลี้ยงได้ นอกจากนี้รายงานผลการทดลองของ Supamattaya *et al.* (1998) พบว่าเชื้อไวรัสกลุ่มเดียวกันนี้สามารถติดต่อจากกุ้งกุลาดำสู่กุ้งเคย (*Acetes* sp.) ปูม้า (*Portunus pelagicus)* และปูดำ (*Scylla serrata)* ได้ทั้งการกิน การฉีด และการแช่ และรายงาผลการทดลองของ Kanchanaphum *et al.* (1998) พบว่าไวรัสชนิดนี้ก็สามารถติดต่อจากปูทะเลหลายชนิดสู่กุ้งกุลาดำได้เช่นกัน นอกจากนี้มีรายงานการติดเชื้อไวรัสกลุ่ม baculovirus group C ใน European shore crab (*Carcinus maenas*) blue crab (*Callinetes sapidus*) และในกุ้งคูรุมา (*Penaeus japonicus*) ในประเทศญี่ปุ่น (Huger and Krieg, 1991) โดยที่ไวรัสชนิด SEMBV ที่ก่อให้เกิดโรคจุดขาวที่ระบาดอยู่ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทยก็เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปลาตีน ปลาบู่แคระ ปลาหัวตะกั่ว หอยขี้นก และสัตว์หน้าดินพวกโพลิคีตบางชนิดที่พบกระจายอยู่ทั่วๆไปบริเวณฟาร์มเลี้ยงกุ้งก็สามารถเป็นตัวนำเชื้อไวรัส SEMBV ได้ โดยที่กลุ่มสิ่งมีชีวิตดังกล่าวอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติและในบ่อกุ้งที่เป็นโรคด้วยและสัตว์เหล่านี้อาจจะเป็นตัวนำชิ้นส่วนของเชื้อไวรัส SEMBV กระจายออกสู่พื้นที่ต่างๆและอาจจะติดต่อสู่กุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงอื่นได้เป็นบริเวณกว้าง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานตีพิมพ์การปนเปื้อนเชื้อหรือการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตพวกปลา หอย และโพลิคีต ดังนั้นการศึกษาในลำดับต่อไปกลุ่มผู้ศึกษาจะทำการศึกษาถึงกลไกของเชื้อไวรัส SEMBV ในสัตว์เหล่านี้ต่อไป

และจากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำเบื้องต้นกับการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในพาหะนำเชื้อในพื้นที่ต่างๆ ในแต่ละฤดูกาลพบว่าการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในพาหะนำเชื้อที่พบในฤดูร้อนมีความถี่สูงกว่าในฤดูฝน เนื่องจากในช่วงฤดูร้อนของภาคใต้โดยเฉพาะแถบพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตกจะมีระยะเวลานานกว่าฤดูฝนมาก แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในแถบพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกระยะเวลาในฤดูฝนยาวนานพอๆ กันกับช่วงฤดูร้อนส่งผลให้พบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในพาหะธรรมชาติในฤดูฝนของแถบนี้สูงกว่าแถบพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตก อีกทั้งพบการแพร่กระจายของเชื้อชนิดนี้ในพาหะธรรมชาติบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันออกสูงกว่าบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลตะวันตก ซึ่งสัมพันธ์กับสภาวะการเกิดโรคอย่างชัดเจนและอาจจะอธิบายได้จากลักษณะภูมิประเทศของฝั่งทะเลตะวันออกเป็นแบบปิดการไหล

เวียนของน้ำอยู่ในพื้นที่อ่าวรวมทั้งการประกอบการการเลี้ยงกุ้งมีมายาวนานกว่า อีกทั้งการจัดการที่ไม่เหมาะสม สภาพสิ่งแวดล้อมในพื้นที่มีความเสื่อมโทรมลงก็อาจเป็นสาเหตุให้การแพร่กระจายของเชื้อโรคต่างๆรวมทั้งไวรัสมีความรุนแรงสูงขึ้นในกุ้งกุลาดำ

นอกจากนี้การศึกษาพบว่าในฤดูกาลที่แตกต่างกันค่าความเป็นกรด-ด่างของ (pH) และความเค็มของน้ำก็มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในธรรมชาติด้วยคือ ในช่วงฤดูร้อนค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าที่แตกต่างกันในช่วงกว้างและในขณะเดียวกันพบว่าในฤดูร้อนน้ำมีความเค็มสูงกว่าในช่วงฤดูฝนพบ และโดยทั่วๆไปแล้วการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างของน้ำในช่วงฤดูร้อนมีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในรอบวัน สภาพแวดล้อมดังกล่าวทำให้สัตว์น้ำมีความเครียดมากขึ้นโอกาสในการยอมรับเชื้อจึงสูงขึ้น สอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในพาหะธรรมชาติสูงขึ้นในฤดูร้อน ซึ่งสัมพันธ์กันกับการศึกษาของ Lo *et al.* (1996) ในประเทศได้หวันที่พบว่าการแพร่กระจายของ WSBV ในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่จับจากธรรมชาติในฤดูร้อนมีความถี่สูงกว่าฤดูหนาวและฤดูฝนเนื่องจากในประเทศได้หวันช่วงฤดูร้อนเป็นช่วงที่กุ้งกุลาดำในธรรมชาติวางไข่ กุ้งจะมีความอ่อนแอและเครียดมากประกอบกับการผันแปรของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)ที่แตกต่างกันมากกุ้งจึงยอมรับเชื้อได้มากขึ้น ดังนั้นในช่วงฤดูร้อนเกษตรกรจึงควรระมัดระวังมากขึ้นทั้งในการคัดเลือกพันธุ์ลูกกุ้ง การเตรียมบ่อการกำจัดพาหะให้หมดก่อนที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ รวมทั้งป้องกันไม่ให้พาหะเข้าสู่บ่อเลี้ยงในช่วงการเลี้ยงและโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เกษตรกรจะต้องมีการจัดการการเลี้ยงที่เป็นระบบเช่นมีบ่อพักน้ำ มีการตรวจสอบสุขภาพกุ้งเป็นระยะๆ มีการใช้ยาและสารเคมีอย่างมีความเข้าใจและถูกต้องก็จะช่วยกุ้งมีความแข็งแรงมีความต้านทานการติดเชื้อไวรัสและเชื้อโรคอื่นๆได้มากขึ้น ส่งผลให้การประกอบการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นธุรกิจที่ยั่งยืนอยู่ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุน ทุนวิจัยประเภทเร่งด่วนของ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีงบประมาณ 2541 ขอขอบคุณ คุณสุนันท์ ช่วยป้อง คุณจันทร์จิรา จอมสวัสดิ์ คุณฉัฐมา พงษ์ประยูร คุณนเรศ ช่วนยุก คุณนรินทร์ สงสีจันทร์ คุณสุภฎา คีรีรัฐนิคม และคุณอภิญญา ส่งประดิษฐ์ ในการเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ตัวอย่างสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Boyd, C.E. and Tucker, C.S. 1992. Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture. Alabama Agriculture Experiment Station, Auburn University, Alabama. 183 p.

Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C. and Lo, C.F. 1995. Pathogenicity of the baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis. Aquat. Org. 23: 165-173.

Huger, A.M. and Krieg, A. 1991. Baculoviridae : Nonoccluded baculoviruses. in Atlas of invertebrate viruses ed. J.R. Adam and J.R. Bonami. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 287-319

Inouye, K., Yamano, K., Ikeda, N., Kimura, T., Nakaho, H., Momoyama, K., Kobayashi, J. and Miyajima, S. 1996. The penaeid rod- shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute virus viremia (PAV). Fish Pathol. 31: 39-45

Kanchanaphum, P., Wongteerasupaya, C., Sitidilokratana, N., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachamnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1998. Experimental transmission of White Spot Syndrome Virus (WSSV) from crabs to shrimp *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. (in press)

Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S., Khongpradit, R. and Akpanithanpong, U. 1995. Mass mortality caused by systemic bacilliform virus in cultured penaeid shrimp, *Penaeus monodon*, in Thailand. Asian Shrimp News. 5: 2-3

Kasornchandra, J., Boonyaratpalin, S. and Itami, T. 1997. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia, Microscopic observation and polymerase chain reaction. Technical paper No. 8/1997, National Institute of Coastal Aquaculture, Songkhla. 16 p.

Kasornchandra, J., and Boonyaratpalin, S. 1995. Light and electron microscope evidence of systemic bacilliform virus infection in *Penaeus chinensis*. In Proceedings of the seminar on Fisheries 1994, Department of Fisheries, 19-21 Sept. 1994, Bangkok, Thailand, 503-506

Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H. and Kou, G.H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. Dis. Aquat. Org. 25: 133-141

Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, Lui, K.F., Chiu,Y.L., Yeh, P.Y., Peng, S.E., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H. 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

Nakano, H., Koube, H., Umesawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K. and Oseko, N. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trial. Fish Patholo. 29: 135-139

Nash, G.L. 1995. SEMBV- An emerging viral treat to cultured shrimp in Asia, Asian Shrimp News. 4: 2-3

Supamattaya, K. and Boonyaratpalin, S. 1996. The study of histopathology and cytopathology changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) caused by yellow-head virus and red color and white spot disease virus. Songklanakarin J. Sci. Technol. 18(1): 17-33

Supamattaya, K., Hoffmann, R.W., Boonyaratpalin, S. and Kanchanaphum, P. 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. Dis. Aquat. Org. 32: 79-85.

Takahashi, Y., Itami, M., Kondo, M., Maeda, M., Fujii, R., Tomanaga, S., Supam, K. and Boon, S. 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish. Pathol. 29: 121-125

Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirono, I. and Aoki, T. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) in *Penaeus monodon* Fabricius. J. of Fish Disease. 19: 399-403

Wang, C.S., Tsai, Y.J., Kou, G.H. and Chen, S.N. 1997. Detection of white spot didease virus infection in wild-caught greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis* (de Haan) in Thaiwan. Fish Patholo. 32 (1): 35-41

Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.H., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachamnarnkul, B. and Flegel, T.W. 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the back tiger prawn *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 21: 69-77

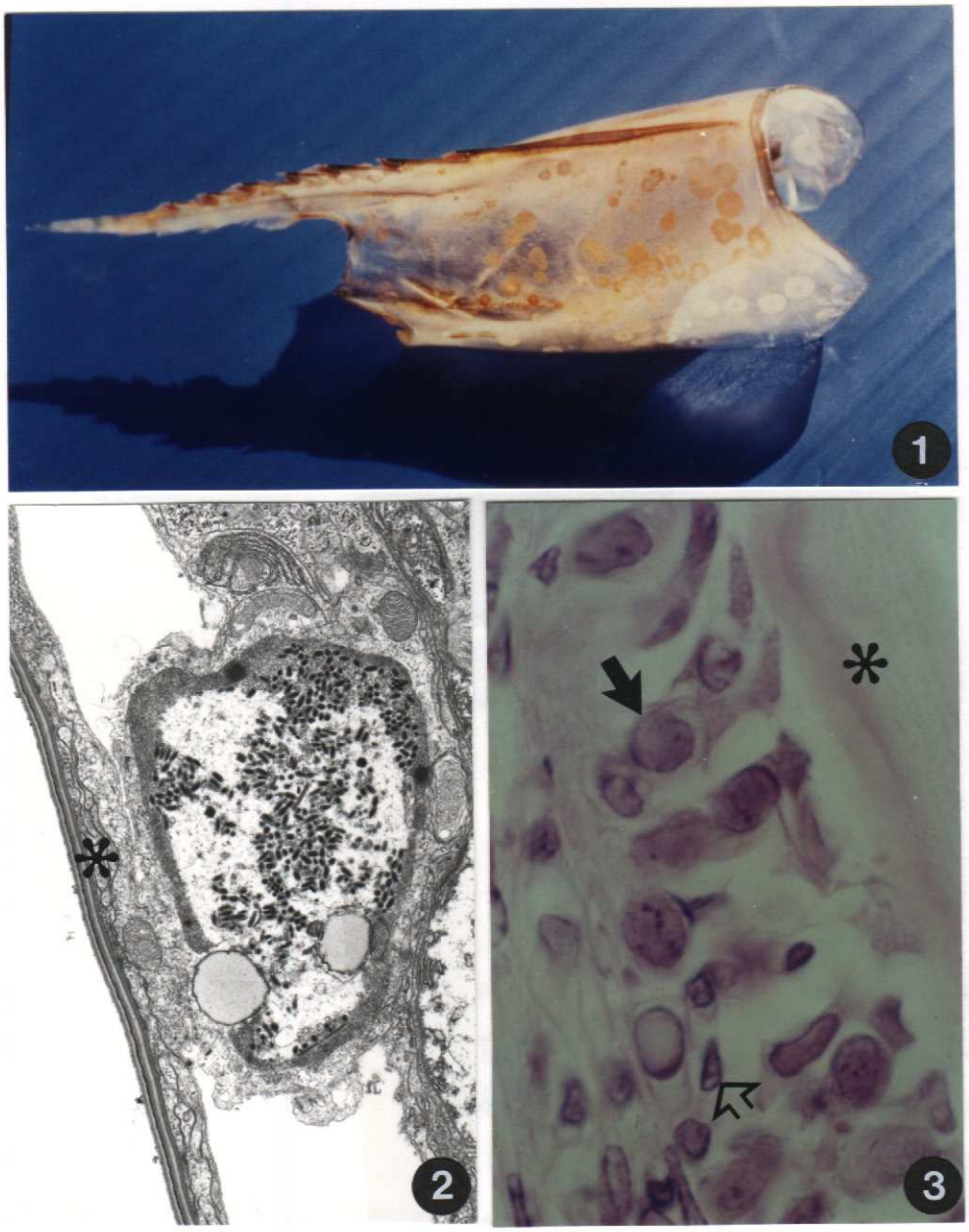

Figure 1 Carapace of black tiger shrimp *Penaeus monodon* with white spot syndrome caused by Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV)

Figure 2 Electron micrograph of a SEMBV infected black tiger shrimp, cell showing virus particles in the nuclei of epithelial cells. The cuticle is indicated by an asterisk, uranyl acetate and lead citrate, 7000X

Figure 3 Subcuticular epidermal of a SEMBV infected black tiger shrimp, infected cell exhibiting hypertrophic nuclei (dense arrow) compare with normal cell (open arrow), the cuticle is indicated by an asterisk, paraffin section, H&E, 300X

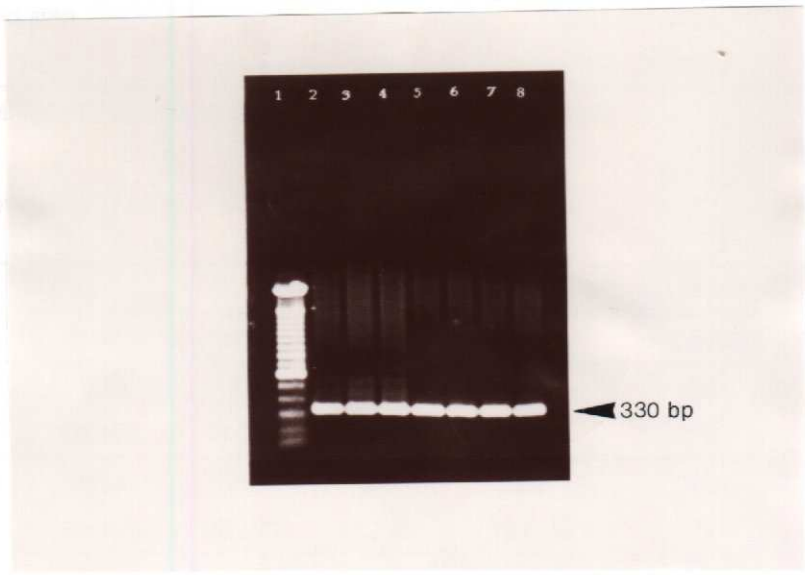

Figure 4 Amplification of the PCR product of white spot viruses collected from suspected virus carriers in southern Thailand. Lane 1 MW = 100 bp DNA size marker, lanes 2-7 represented DNA fragments of the virus from *Acetes* sp., *Penaeus merguiensis*, *Macrobrachium equideus*, *Sesarma merderi*, *Periophthalmus* sp and Gastropod (Family Cerithidae). Lane 8 represented viral DNA fragments from infected *Penaeus monodon* serving as positive control.

Table 1 DNA fragments of SEMBV detected by 2-step PCR diagnostic with DNA template

SEMBV diagnostic PCR	Product analysis of suspected virus (SEMBV) carriers*
Positive in first step	4/217 (1.84%)
Positive in second step	73/217 (33.64%)
Negative in both steps	144/217 (66.36%)

* Number of positive SEMBV diagnostic PCR / Number of total sample

Table 2 The prevalence of SEMBV in different groups of carriers

Period	Prevalence of SEMBV in different of carriers*						
	shrimp	crab	fish	gastropod	polychaete	plankton	barnacle
Oct.-Dec. 1997	5/13	1/7	6/6	4/6	0/6	1/6	0/5
	38.46%	14.29%	100%	66.67%	0%	16.67%	0%
Jan.-Mar. 1998	5/13	2/9	2/6	1/6	0/6	3/6	0/6
	38.46%	22.22%	33.33%	16.67%	0%	50.0%	0%
Apr.-Jun. 1998	10/18	5/10	6/9	4/6	1/6	1/6	0/6
	55.55%	50.0%	66.67%	66.67%	16.67%	16.67%	0%
Jul.-Sept. 1998	2/14	1/9	7/10	4/6	1/5	1/6	0/5
	14.29%	11.11%	70.0%	66.67%	20.0%	16.67%	0%
Total	22/58	9/35	21/31	13/24	2/23	6/24	0/22
	37.93%	25.71%	67.74%	54.17%	8.70%	25.0%	0%

* Number of positive SEMBV diagnostic PCR/ Number of total sample

Table 3 The frequency distribution of SEMBV among crustaceans (shrimps and crabs) and other specimens (fish, gastropod, benthic polychaetes, plankton and barnacle)

Period	Prevalence of SEMBV in carriers*	
	crustaceans	other specimens
Oct.-Dec. 1997	6/20 (30.0%)	11/29 (37.93%)
Jan.-Mar. 1998	7/22 (31.82%)	6/30 (20.0%)
Apr.-Jun. 1998	15/28 (53.57%)	12/33 (36.36%)
Jul.-Sept. 1998	3/23 (13.04%)	13/32 (40.63%)
Total	31/93 (33.33%)	42/124 (33.87%)

* Number of positive SEMBV diagnostic PCR/ Number of total sample

Central Library
Prince of Songkhla University

Table 4 Geographic distribution of SEMBV in carriers*

Period	East coast			West coast		
	Songkhla-Nakorn	Pattani	Suratthani	Satun	Trang	Krabi
Oct.-Dec. 1997	3/8	3/8	3/8	2/7	4/9	2/9
Jan.-Mar. 1998	3/8	1/9	4/8	2/8	1/9	2/10
Apr.-Jun. 1998	7/9	4/11	5/10	3/11	4/10	4/10
Jul.-Sept. 1998	5/10	2/11	3/10	2/4	2/8	2/12
Total	18/35	10/39	15/36	9/30	11/36	10/41
	51.43%	25.64%	41.67%	30.0%	30.56%	24.39%

* Number of positive SEMBV diagnostic PCR/ Number of total sample

Table 5 Prevalence of SEMBV in carriers in relation to the different localities and season

Season	Prevalence of SEMBV in carriers*		Total
Dry	26/61 (42.62%)	24/83 (28.92%)	50/144
	(Apr.-Sept.)	(Oct.-Jun.)	(34.72%)
Rainy	17/49 (34.69%)	6/24 (25.0%)	23/73
	(Oct.-Mar.)	(Jul.-Sept.)	(31.51%)
	43/110 (39.09%)	30/107 (28.04%)	73/217 (33.64%)

* Number of positive SEMBV diagnostic PCR/ Number of total sample

Table 6 The water quality in different localities and season

Water parameter	East coast		West coast	
	Dry (Apr.-Sept.)	Rainy (Oct.-Mar.)	Dry (Oct.-Jun.)	Rainy (Jul.-Sept.)
pH	7.38-8.09	7.90-7.95	7.26-8.21	7.38
Salinity (ppt)	22.0-31.3	16.5-18.5	23.0-30.6	25.9
Alkalinity (ppm)	100-109.3	104-131.7	107-112.7	97.17

ppt : parts per thousand

ppm : parts per million