

การพัฒนาเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัย
infectious myonecrosis virus (IMNV) และ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei*



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มีนาคม 2556

การพัฒนาเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัย
infectious myonecrosis virus (IMNV) และ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei*



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มีนาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัย
infectious myonecrosis virus (IMNV) และ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei*



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มีนาคม 2556

ศรัญญา ปลาอ่อน. (2556). การพัฒนาเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัย *infectious myonecrosis virus (IMNV)* และ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei*. ปรินญาณิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.ปริญทร์ ชัยวิสุทธางกูร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์.

Infectious myonecrosis virus (IMNV) และ *Vibrio alginolyticus* เป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง ซึ่งสร้างความเสียหายเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV และ *V. alginolyticus* ด้วยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิคงที่ คือ 65°C (สำหรับการตรวจเชื้อ IMNV) และ 60°C (สำหรับการตรวจเชื้อ *V. alginolyticus*) ซึ่งใช้เวลาเพียง 60 นาที ก็สามารถวิเคราะห์ผลของ LAMP product ที่ได้ด้วยการทำ gel electrophoresis และวิธี lateral flow dipstick (LFD) ตามลำดับ งานวิจัยนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 4 เส้น ที่จำเพาะต่อยีน capsid protein ของ IMNV และยีน *rpoS*-like sigma factor (*rpoX*) ของ *V. alginolyticus* จากการศึกษาพบว่าการตรวจเชื้อ IMNV ด้วยเทคนิค RT-LAMP พบว่ามีความไวในการตรวจเชื้อที่ 3.8×10^3 อนุภาค ซึ่งมีความไวในการตรวจมากกว่าเทคนิค RT-PCR ถึง 100 เท่า และเทคนิค RT-LAMP ไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับไวรัสในกุ้งชนิดอื่นๆ ส่วนการตรวจสอบการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ทำการวิเคราะห์ LAMP product ด้วยวิธี lateral flow dipstick (LFD) โดยการนำ biotinylated-LAMP product ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา hybridization กับ FITC-labeled probe ที่อุณหภูมิ 63°C เป็นเวลา 5 นาที พบว่าความเข้มข้นของ probe ที่เหมาะสมคือ 20 พิโคโมล สำหรับความไวในการตรวจเชื้อ *V. alginolyticus* กับเชื้อที่เลี้ยงแบบบริสุทธิ์ (pure culture) พบว่ามีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 1.8×10^2 CFU ml⁻¹ หรือ 0.6 CFU reaction⁻¹ ส่วนเทคนิค PCR มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 1.8×10^3 CFU ml⁻¹ หรือ 6 CFU reaction⁻¹ และจากการทดสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ที่เติมในตัวอย่างกุ้ง (spiking) พบว่าเทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 2×10^3 CFU g⁻¹ หรือ 4 CFU reaction⁻¹ ส่วนเทคนิค PCR มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 2×10^4 CFU g⁻¹ หรือ 40 CFU reaction⁻¹ ซึ่งเทคนิค LAMP-LFD สามารถตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ทั้ง 21 isolates และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสและแบคทีเรียชนิดอื่น เทคนิค LAMP ที่ใช้ตรวจสอบการติดเชื้อทั้ง IMNV และเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสอบสูง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ IMNV และเชื้อ *V. alginolyticus* ในห้องปฏิบัติการ รวมถึงในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งได้

DEVELOPMENT OF LOOF-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION BASED ASSAYS
FOR DETECTION OF INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS (IMNV)
AND *VIBRIO ALGINOLYTICUS* IN SHRIMP (*PENAEUS VANNAMEI*)



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University

March 2013

Sarunya Pla-on. (2013). *Development of loop mediated isothermal amplification (LAMP)-based assays for detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) and Vibrio alginolyticus in shrimp (Penaeus vannamei)*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Parin Chaivisuthangkura, Assist. Prof. Dr. Siwaporn Longyant.

Infectious myonecrosis virus (IMNV) and *Vibrio alginolyticus* are the important pathogens in white shrimp. In this study, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) techniques for detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) and *Vibrio alginolyticus* in shrimp were developed. LAMP is a rapid method that can amplify nucleic acid under isothermal condition with high specificity and sensitivity. The reaction was performed at 65°C (for IMNV detection) or 60°C (for *V. alginolyticus* detection) for 60 minutes and the amplified products were analyzed by gel electrophoresis and lateral flow dipstick (LFD), respectively. For IMNV detection, the LAMP amplicon was produced by a set of four designed primers that recognized the capsid protein gene of IMNV. The RT-LAMP assay can detect 3.8×10^3 copies of viral particles which was 100 times more sensitive than that of RT-PCR. The RT-LAMP showed no cross reaction with nucleic acids extracted from other viral pathogens. In the case of *V. alginolyticus*, the biotinylated-LAMP amplicon specific to *rpoS*-like sigma factor (*rpoX*) gene was hybridized with an FITC-labeled probe (20 pmole) at 63 °C for 5 minutes followed by lateral flow dipstick (LFD) detection. The sensitivity of LAMP for *V. alginolyticus* detection in pure culture was 1.8×10^2 CFU ml⁻¹ or equivalent to 0.6 CFU reaction⁻¹, while that of PCR was 1.8×10^3 CFU ml⁻¹ or equivalent to 6 CFU reaction⁻¹. In spiked shrimp samples without enrichment, the detection limit for *V. alginolyticus* was 2×10^3 CFU g⁻¹ or equivalent to 4 CFU reaction⁻¹, while that of PCR was 2×10^4 CFU g⁻¹ or equivalent to 40 CFU reaction⁻¹. The LAMP-LFD method for *V. alginolyticus* accurately identified 21 isolates of *V. alginolyticus* but did not detect non-*alginolyticus* *Vibrio* isolates and non-*Vibrio* isolates. In summary, the LAMP methods developed in this study are sensitive and rapid for specific detection of IMNV and *V. alginolyticus* infection and can be used in laboratory and shrimp farm culture.

ปริญญาบัตร

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจวินิจฉัย
infectious myonecrosis virus (IMNV) และ *Vibrio alginolyticus* ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei*
ของ
ศรัณญา ปลาอ่อน

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒน์กุล)

วันที่ เดือน มีนาคม พ.ศ. 2556

คณะกรรมการควบคุมปริญญาบัตร

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุบัณฑิต นิมรัตน์)

..... กรรมการ

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีนทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ประวดี อังประภาพรชัย)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่มีความสำเร็จลงได้หากขาดความช่วยเหลือ และคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปริญทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ร่วม ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และให้คำแนะนำแก่ข้าพเจ้าในด้านต่างๆ ทั้งในด้านวิทยาการ ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญาานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล อาจารย์ ดร. ประวัติ อังประภาพรชัย อาจารย์ ดร. ณิชฎีกา สุวรรณาศรัย และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ได้ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุภัณฑิลา นิมรัตน์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในแวดวงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. แสงจันทร์ เสนาปิ่น ที่ได้ให้ตัวอย่างกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV สำหรับใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณนโรดม แพนโรสง พี่น้องและเพื่อนๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มอบให้แก่ข้าพเจ้าในทุกๆ ด้าน

ข้าพเจ้าขอโน้มระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ได้ให้กำลังใจ คอยช่วยเหลือ คอยสนับสนุน คอยเป็นแรงผลักดัน และชื่นชมในความเพียรพยายามของข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญาานิพนธ์จนเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอระลึกถึงคุณพระศรีรัตนตรัยและจะนำเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ สัตว์ทวดลอง และกุ้งทุกตัว ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญาานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ศรัณญา ปลาอ่อน

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	4
ขอบเขตการวิจัย.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
กุ้งขาว (Pacific white shrimp).....	6
ลักษณะทั่วไป.....	7
วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์.....	8
ขั้นตอนการพัฒนาของตัวอ่อน.....	8
โรคในกุ้ง.....	10
เชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อโรคในกุ้ง.....	10
Infectious Myonecrosis Virus (IMNV)	12
จีโนมของ IMNV.....	13
อาการของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV.....	13
พยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV.....	14
การตรวจการติดเชื้อ IMNV.....	16
เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้ง	18
Vibriosis	20
<i>Vibrio alginolyticus</i>	21
ยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ <i>V. alginolyticus</i>	22
การตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>	23
Loop mediated isothermal amplification (LAMP)	25
กลไกการทำงานของ LAMP.....	26
วิธีการวิเคราะห์ LAMP product.....	28
ข้อดีของเทคนิค LAMP.....	30
Lateral flow dipstick (LFD)	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย..... 33
สัตว์ทดลอง..... 33	
อุปกรณ์และสารเคมี..... 33	
การตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV..... 34	
สกัด RNA ของไวรัสในกึ่งตัวอย่าง..... 34	
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ RT-LAMP-IMNV..... 34	
การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ RT-LAMP-IMNV..... 35	
การเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ระหว่างเทคนิค RT-LAMP กับเทคนิค RT-PCR..... 36	
การหาความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ IMNV โดยใช้เทคนิค RT-LAMP..... 37	
การศึกษาความไวของเทคนิค RT-LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ IMNV..... 37	
การตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> 37	
การเตรียมแบคทีเรีย..... 37	
การสกัด DNA ของแบคทีเรีย..... 38	
การวิเคราะห์เชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ด้วยวิธี PCR..... 39	
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ LAMP-LFD ของ <i>V. alginolyticus</i> 39	
การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ LAMP- <i>V. alginolyticus</i> 40	
การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ในการวิเคราะห์ LAMP product ด้วยวิธี Lateral flow dipstick..... 41	
การตรวจสอบความไวของการวิเคราะห์เชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ในสภาพเชื้อ บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค LAMP-LFD และเทคนิค PCR..... 42	
การตรวจสอบหาความไวในการวิเคราะห์เชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ในตัวอย่าง ของกึ่งที่เติมเชื้อ(spiking) โดยใช้ LAMP-LFD และเทคนิค PCR..... 42	
4	ผลการทดลอง..... 44
การตรวจสอบเชื้อ Infectious myonecrosis virus (IMNV) 44	
อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ RT-LAMP-IMNV..... 44	

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ระหว่าง เทคนิค RT-LAMP กับเทคนิค RT-PCR.....	45
การหาความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ด้วยเทคนิค RT-LAMP.....	46
การหาความไวของเทคนิค RT-LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ IMNV.....	47
การตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i>.....	48
การวิเคราะห์แบคทีเรีย <i>V. alginolyticus</i> ด้วยวิธี 16S rDNA.....	48
การวิเคราะห์เชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ด้วยวิธี PCR.....	48
การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ LAMP- <i>V. alginolyticus</i>	50
การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ในการวิเคราะห์ LAMP product ด้วยวิธี Lateral flow dipstick.....	52
การหาความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ด้วยเทคนิค LAMP -LFD และ PCR.....	53
การหาความไวในการตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ในสภาพเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค LAMP-LFD และ PCR.....	55
การหาความไวในการตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ในตัวอย่างของกุ้งที่ เติมเชื้อ (spiking) ด้วยเทคนิค LAMP-LFD และ PCR.....	57
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	59
บรรณานุกรม.....	64
ภาคผนวก.....	73
ภาคผนวก ก.....	74
ภาคผนวก ข.....	75
ภาคผนวก ข.....	76
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	77

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในการทำ RT-LAMP -IMNV	35
2 ส่วนผสมของการทำ RT- LAMP – IMNV.....	35
3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RT- PCR- IMNV.....	36
4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR	39
5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ LAMP-LFD	40
7 แสดงส่วนผสมของการทำ LAMP - <i>Vibrio alginolyticus</i>	41
8 แสดงแบคทีเรีย isolates ต่างๆ ที่ใช้การตรวจสอบด้วยวิธี PCR.....	53



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งขาว <i>Penaeus vannamei</i>	7
2 วงจรชีวิตของกุ้งขาว <i>Penaeus vannamei</i>	8
3 แสดงกุ้งวัยอ่อนของกุ้งในระยะต่างๆ	9
4 แสดงลักษณะอนุภาคของเชื้อ IMNV ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	12
5 แสดงจีโนมของ IMNV.....	13
6 ลักษณะภายนอกของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV	14
7 กุ้งขาวที่มีการติดเชื้อ IMNV กล้ามเนื้อส่วนหาง.....	14
8 แสดงลักษณะการตายของกล้ามเนื้อ (myonecrosis) ที่เกิดจากการฉีดอนุภาคของเชื้อ IMNV หลังการย้อมเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อด้วยสี hematoxylin และ eosin.....	15
9 ลักษณะการตายของกล้ามเนื้อ (myonecrosis) ที่เกิดจากการฉีดอนุภาคของเชื้อ IMNV โดยการใช้เทคนิค <i>in situ</i> hybridization	17
10 แสดงการตายของเซลล์ตับและตับอ่อนของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อโรค Vibriosis.....	21
11 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค LAMP	26
12 ขั้นตอนการสร้าง Dumbbell-shaped DNA structures ใน initial step เพื่อใช้เป็น DNA template ในเทคนิค LAMP	27
13 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA แบบหมุนเวียนต่อเนื่อง (cycling amplification step)	28
14 การวิเคราะห์ LAMP product โดยดูจากความขุ่นของหลอดทดลอง	29
15 การวิเคราะห์ LAMP product โดยดูจากสีของสารฟลูออเรสเซนต์.....	30
16 แสดงส่วนประกอบต่างๆของ lateral flow dipstick (LFD)	32
17 แสดงผลจากการวิเคราะห์ LAMP product ด้วย Lateral flow dipstick (LFD).....	32
18 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ capsid protein gene ของ IMNV	34
19 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoX</i> ของ <i>Vibrio alginolyticus</i> ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์.....	40
20 แสดงผลการทำ RT-LAMP reaction ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	44
21 แสดงการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ระหว่างเทคนิค RT-LAMP กับเทคนิค RT-PCR.....	45
22 แสดงการทำ RT-LAMP โดยใช้ RNA หรือ DNA ของไวรัสชนิดอื่นๆ.....	46
23 แสดงการทำ RT-LAMP โดยใช้ RNA ที่สังเคราะห์ได้ในหลอดทดลอง.....	47

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
24 แสดงการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ยีน <i>rpoX</i> เป็นยีนเป้าหมาย.....	48
25 แสดงการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ยีน <i>gyrB</i> เป็นยีนเป้าหมาย.....	49
26 แสดงการทำ LAMP ที่อุณหภูมิต่างๆ	50
27 แสดงการทำ LAMP ที่เวลาต่างๆ.....	51
28 แสดงการทำ LAMP-LFD โดยใช้ DNA probe.....	52
29 แสดงการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ในสภาพเชื้อ ที่เลี้ยงแบบบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยเทคนิค LAMP และ PCR.....	55
30 แสดงความไวในการตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ในสภาพเชื้อที่เลี้ยงแบบบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยเทคนิค LAMP-LFD.....	56
31 แสดงการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ในตัวอย่าง ของกึ่งที่เติมเชื้อ (spiking) ด้วยเทคนิค LAMP และ PCR.....	57
32 แสดงการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ <i>V. alginolyticus</i> ในตัวอย่าง ของกึ่งที่เติมเชื้อ (spiking) ด้วยเทคนิค LAMP-LFD.....	58

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก โดยประเทศไทยสามารถผลิตได้เป็นอันดับ 2 ของโลก และส่งออกเป็นอันดับ 1 ของโลก เนื่องจากเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ ทำให้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวมากขึ้น อาจกล่าวได้ว่า มีผลผลิตมากกว่า 99% ของผลผลิตกุ้งทั้งหมด ดังนั้นอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวจึงเป็น อุตสาหกรรมการเกษตรที่มีขนาดใหญ่ และมีความสำคัญ ปริมาณการส่งออกกุ้งขาวของไทยมี แนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา (2010-2011) อุตสาหกรรมกุ้งขาวของไทยได้ รับอานิสงค์จากผลผลิตกุ้งขาวโลก ที่ปรับลดลงจากประเทศผู้ผลิตสำคัญต่างก็ประสบปัญหาภัย ธรรมชาติและโรคระบาด ทำให้ราคากุ้งปรับตัวสูงขึ้น ส่งผลให้ ในปี 2011 แม้ว่าไทยเราจะมีปริมาณ การส่งออกลดลง แต่ทว่ามูลค่าการส่งออกกุ้งขาวและผลิตภัณฑ์กลับสูงถึงกว่า 100,000 ล้านบาท แต่อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งขาวของไทยก็กำลังประสบปัญหาโรคระบาดที่เกิดขึ้นซ้ำเติมการเสีย โอกาสในตลาดส่งออกของไทย โดยเริ่มระบาดอย่างหนักตั้งแต่ต้นปี 2011 กระทั่งทำให้ผลผลิตกุ้ง ขาวโดยรวมปี 2012 ลดลงประมาณร้อยละ 10 - 20 เนื่องมาจากโรคระบาด (ถนอมจิตร สิริภคพร. 2555: 1-2)

สำหรับการติดเชื้อไวรัสในกุ้งขาวมีรายงานการแพร่ระบาดของโรคที่ก่อให้เกิดผลเสียหาย ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ โรคที่เกิดจาก Taura syndrome virus (TSV) เป็นโรคที่มีผลกระทบต่อ การค้าและการขนส่งกุ้งขาวระหว่างประเทศ นับตั้งแต่ปี 1991 เป็นต้นมา โรคนี้ก่อให้เกิดความ สูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งขาวและการค้ากุ้งขาวมากถึง 1 ถึง 2 พันล้าน ดอลลาร์สหรัฐฯ (Lightner et al., 1995: 1-12; Overstreet et al., 1997: 165-176) พบได้ทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย ในปี 2003 ได้พบการระบาดของโรคนี้เป็นครั้งแรกในกุ้งขาวที่เลี้ยงในภาค กลางของประเทศไทย ต่อมาในช่วงต้นปี 2004 มีการตรวจพบโรคนี้ในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้มี รายงานการตรวจพบเชื้อนี้ในกุ้งชนิดอื่นได้ด้วย เช่น *P. stylirostris*, *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. merguensis* (กุ้งแชบ๊วย), *P. monodon* (กุ้งกุลาดำ) ด้วยเหตุที่โรคนี้มีความร้ายแรงและแพร่ระบาด อย่างรวดเร็ว (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ. 2551: 89-121) โรคที่เกิดจาก Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) เป็นโรคที่มีผลกระทบต่อการค้ากุ้งและผลิตภัณฑ์กุ้ง ระหว่างประเทศ พบครั้งแรกที่เกาะฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1981 โดยการระบาดครั้งนั้น ทำให้กุ้งขาวตายมากกว่า 90% (Lightner; et al. 1992: 97-105) พบการระบาดของโรคนี้ในไทย เป็นครั้งแรกในปี 2003 (ชลอ ลิมสุวรรณ; และพรเลิศ จันทรรักษ์ชกุล. 2547: ไม่ปรากฏเลขหน้า) โรคที่เกิดจาก White spot syndrome virus (WSSV) ตั้งแต่ปี 1993 เป็นต้นมา ก่อให้เกิดความ เสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวมากถึงหนึ่งหมื่นล้าน ดอลลาร์สหรัฐฯ และพบได้แทบ

ทุกภูมิภาค และในหลายประเทศ รวมถึงประเทศไทย ก็พบโรคนี้เช่นกัน (Lightner. 1999: 27-52) ทำให้กุ้งขาวมีอัตราการตายสูงภายในเวลารวดเร็ว ก่อให้เกิดผลเสียหายรุนแรงเช่นเดียวกับในกุ้งกุลาดำ

และในปี 2002 โรคที่เกิดจากไวรัสอีกชนิดหนึ่งที่มีความรุนแรงและกำลังแพร่ระบาดเป็นอย่างมากในกลุ่มประเทศอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งขาวในขณะนี้ก็คือโรคที่เกิดจาก infectious myonecrosis virus (IMNV) พบครั้งแรกที่ประเทศบราซิลในฟาร์มกุ้งขาว ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งขาวเป็นอย่างมาก (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72) ต่อมาในปี 2006 ได้พบโรคนี้เป็นครั้งแรกในทวีปเอเชีย ที่ประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งก็ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากเช่นกัน กุ้งขาวที่ติดเชื้อ IMNV พบว่ากล้ามเนื้อมีลักษณะขาวขุ่นบริเวณลำตัวและส่วนหาง โดยเฉพาะปล้องสุดท้าย กุ้งบางตัวบริเวณแพนหาง จะมีสีแดงเข้มขึ้นคล้ายกับกุ้งที่ต้มสุกแล้ว ซึ่งอาการเหล่านี้จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้กุ้งมีอัตราการตายสะสมสูงถึง 70% (Senapin; et al. 2007: 32-38) แต่ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานว่าพบการระบาดของเชื้อ IMNV

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ IMNV ในเบื้องต้น โดยดูจากอาการ (clinical sign) และพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป ตรวจเนื้อเยื่อเพื่อวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy) (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72) แต่ในการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นมีโอกาสผิดพลาดสูง เนื่องจากอาการของกล้ามเนื้อขาวขุ่นนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การขาดออกซิเจน การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มของน้ำ การติดเชื้อพาราสิตพวกไมโครสปอริเดียน (microsporidian) และการติดเชื้อแบคทีเรีย ในกลุ่ม *Vibrio* sp. และ *Aeromonas* sp. เป็นต้น ดังนั้นการตรวจยืนยันจึงเป็นสิ่งจำเป็น จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล ได้แก่ เทคนิค *in situ* hybridization (ISH) ซึ่งเป็นการออกแบบดีเอ็นเอตรวจสอบ (DNA probe) ที่จำเพาะต่อเชื้อ IMNV และมีความแม่นยำสูง แต่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และใช้เวลานาน ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิค reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72) มาใช้ตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ IMNV และเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเครื่อง thermal cycler เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง และใช้เวลาน้อยกว่าวิธี *in situ* hybridization ต่อมาได้มีการนำเทคนิค real-time PCR (Andrade; et al. 2007: 9-15) เป็นการออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ IMNV และเพิ่มปริมาณเชื้อด้วยเครื่อง real time PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบปริมาณการติดเชื้อ IMNV ได้ เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูง แต่มีข้อจำกัดคือราคาของเครื่อง real-time PCR ที่ค่อนข้างสูง

นอกจากการเลี้ยงกุ้งขาวจะประสบปัญหาจากโรคที่เกิดจากไวรัสแล้ว ก็ยังมีโรคที่เกิดจากแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ด้วยก็คือ โรค Vibriosis ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการเลี้ยงกุ้ง เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp. เช่น *V. parahaemolyticus* กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะมีอัตราการตายสูง กินอาหารน้อยลง สังเกตจากกุ้งไม่มีอุจจาระ และลอกคราบได้ช้าลง hemolymph แข็งตัวช้า ตับ และตับอ่อน

ผิปกติ สีเนื้อจะขุ่น กุ้งจะขึ้นมาเกาะตามขอบบ่อ ตัวกุ้งจะสกปรก มีจุดและตะกอนเกาะตามผิวและเปลือก (Robert-Pillot; et al. 2010: 190-197)

ในกรณีของ *V. harveyi* กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จะเป็นโรคเรืองแสง ซึ่งเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้อย่างมากต่อโรคเพาะฟัก และบ่อดิน พบแพร่กระจายทั่วไปทั้งตามชายฝั่ง และพื้นที่ความเค็มต่ำ เกิดจากสาเหตุโน้มนำหลายประการทั้งคุณภาพน้ำที่ไม่ดีทำให้เชื้อ *V. harveyi* ที่ปกติพบอยู่แล้วในน้ำเข้าทำอันตรายต่อกุ้ง เมื่อกุ้งไม่แข็งแรง กุ้งมีอาการลอยตามขอบบ่อ ไม่กินอาหารหรือกินอาหารได้น้อยลง สีลำตัวจะขุ่น เหงือกมีสีดำ ตับอักเสบ ตับอ่อนสีซีดลง และจะมีการเรืองแสงเกิดขึ้นในเวลากลางคืน พบอัตราการตายสูงในกุ้งระยะวัยอ่อนถึงวัยรุ่น และมักพบเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดและกล้ามเนื้อ (Thaithongnum; et al. 2006: 1-9)

ส่วน *V. vulnificus* ก่อให้เกิดโรคตับอักเสบ พบมากในเขตน้ำกร่อยและเค็ม โดยจะออกฤทธิ์ที่ตับและตับอ่อน ซึ่งเป็นแหล่งสะสมอาหารและสร้างน้ำย่อย สะสมเกลือแร่ และสารพิษต่างๆ ทำให้มีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายโดยเชื้อจะเข้าสู่ตัวกุ้งทางการกินอาหาร และบาดแผล ซึ่งเกิดจากการจัดการภายในบ่อที่ไม่ดี ทำให้เชื้อ *V. vulnificus* ที่มีอยู่ในน้ำเข้าทำอันตรายต่อกุ้ง โดยเฉพาะ ตับและตับอ่อน กุ้งมีอาการอ่อนแอ กินอาหารได้น้อยลง ตับจะมีขนาดโต หรือฝ่อ มีการเปลี่ยนเป็นสีขาวซีด หรือดำคล้ำ กล้ามเนื้อมีสีขาวขุ่น และมีอัตราการตายสูงขึ้น (Dalsgaard; & Hoi. 1997: 1132-1135)

เชื้อไวรัสโอหลายสปีชีส์เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของกุ้งปกติ จึงคาดว่า การติดเชื้อน่าจะผ่านทางระบบทางเดินอาหารเป็นส่วนใหญ่ เชื้อนี้ก่อโรคได้ในกุ้งทุกระยะ ตั้งแต่ไขจนถึงกุ้งโตเต็มวัย อาจพบโรคนี้ได้โรงเพาะฟัก เชื้อนี้อาจเป็นสาเหตุโดยตรงของโรคหรือเป็นเชื้อฉวยโอกาส ซึ่งต้องอาศัยสิ่งโน้มนำอื่น เช่น การติดเชื้อไวรัส หรือความเครียด เชื้อไวรัสโออาจทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร โรคที่ติดเชื้อทั้งตัวกุ้ง (systemic infection) หรือโรคบริเวณเปลือกกุ้ง ซึ่งอาจแสดงอาการต่างๆ กัน

นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ในกุ้งที่ป่วยเป็นโรคในประเทศต่างๆ ได้แก่ ใต้หวัน อินเดีย และเอกวาดอร์ (Lee; et al. 1996: 229-231) กุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีอาการคือ กุ้งกินอาหารลดลง เปลือกนึ่ม อาจมีดวงขาวที่เปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว ตัวกุ้งอาจมีสีแดง กล้ามเนื้อตายมักมีสีขาวขุ่น กุ้งมีอัตราการตายสูง (Esteve & Herrera. 2000: 1-5)

สำหรับการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการตรวจ เช่น การทดสอบทางชีวเคมีในการตรวจวิเคราะห์ และจำแนกชนิดของ *V. alginolyticus* (Alsina & Blanch. 1994: 79-85) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์สูง ใช้เวลามากในการเตรียมตัวอย่าง และไม่สามารถตรวจการติดเชื้อในระยะแรกได้ ต่อมาจึงได้มีความพยายามในการใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยวิธี PCR ในการตรวจเชื้อ *V. alginolyticus* (Di-Pinto; et al. 2005: 150-153; Zhou; et al. 2007: 1364-5072; Zhao; et al. 2011: 137-141) ทำให้การตรวจการติดเชื้อมีความไวสูงขึ้น และสามารถ

ตรวจพบแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยในการติดเชื้อระยะแรก แต่การตรวจสอบต้องใช้เครื่อง thermal cycler ซึ่งมีราคาแพง และใช้เวลาค่อนข้างนาน

อย่างไรก็ตามในการตรวจการติดเชื้อทั้งไวรัส และแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้เทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นในปัจจุบันนี้จึงมีการพัฒนาเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าเทคนิค LAMP สามารถนำมาใช้ตรวจหาไวรัสและแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งและสัตว์ทะเลหลายชนิด อาทิ เช่น การตรวจการติดเชื้อ Taura syndrome virus (TSV) ในกุ้ง (Sappat; et al. 2011: 141-148), การตรวจการติดเชื้อ white spot syndrome virus (WSSV) ในกุ้งขาว (Chou; et al. 2011: 67-74) และ การตรวจการติดเชื้อ *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) ในกุ้งกุลาดำ (Chaivisuthangkura; et al. 2009: 188-193) เป็นต้น

สำหรับการพัฒนาเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อ *Vibrio* spp. นั้นได้มีการนำมาใช้ตรวจหา *V. cholerae* ในกุ้ง (Srisuk; et al. 2010: 36-42), การตรวจสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเล (Wang; et al. 2011: 5765-5771), การตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาว (Prompamorn; et al. 2011: 344-351) และการตรวจหา *V. vulnificus* ในหอยนางรม (Surasilp; et al. 2011: 158-163) เป็นต้น

จากตัวอย่างข้างต้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค LAMP เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว มีความจำเพาะในการตรวจสอบสูง สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ภายในระยะเวลาอันสั้น ทำให้สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสและแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการทำ LAMP จำเป็นต้องใช้วิธี agarose gel electrophoresis และต้องมีการใช้ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ทำให้ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจในฟาร์มกุ้ง จึงได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ LAMP product ที่ได้ ด้วยวิธี Lateral flow dipstick (LFD) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ง่าย ปลอดภัย และใช้เวลาไม่นานในการทราบผล

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาเทคนิค reverse transcriptase-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อ IMNV ในตัวอย่างกุ้งขาว *P. vannamei* โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ capsid protein gene ของ IMNV และพัฒนาเทคนิค LAMP-LFD ในการตรวจหาเชื้อ *V. alginolyticus* โดยมีการออกแบบ primers ให้มีความจำเพาะต่อยีน *rpoX* ของ *V. alginolyticus* ที่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว เป็นการช่วยลดปัญหาการเป็นโรค การตาย และการแพร่ระบาดของโรคกุ้งในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งได้

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค RT-LAMP เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ในกุ้ง ขาว
2. เพื่อพัฒนาเทคนิค LAMP-LFD ในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในกุ้งขาว

ขอบเขตของการวิจัย

1. พัฒนาริธีตรวจสอบเชื้อ IMNV ในกุ้งขาว *P. vannamei* โดยใช้เทคนิค RT-LAMP
2. เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ที่ได้จากเทคนิค RT-LAMP และเทคนิค RT-PCR
3. ศึกษาความจำเพาะของเทคนิค RT-LAMP ในการตรวจเชื้อ IMNV
4. พัฒนาริธีตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างกุ้งโดยใช้เทคนิค LAMP-LFD
5. เปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* โดยเทคนิค LAMP-LFD และเทคนิค PCR
6. ศึกษาความจำเพาะของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus*

สมมติฐานในการวิจัย

การนำเทคนิค RT-LAMP มาใช้ตรวจสอบเชื้อ IMNV และเทคนิค LAMP-LFD ในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างกุ้งขาว *P. vannamei* น่าจะเป็นวิธีที่รวดเร็วกว่า มีความจำเพาะ และมีความไวสูงกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ที่จำเพาะต่อเชื้อทั้งสอง

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เทคนิค RT-LAMP ที่สามารถตรวจการติดเชื้อ IMNV ได้
2. เทคนิค LAMP-LFD ที่สามารถตรวจการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุ้งขาว (Pacific white shrimp)

อนุกรมวิธาน

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Superorder	Eucarid Ecarida
Order	Decapoda
Section	Penaeidea
Family	Penaeidae
Genus	<i>Penaeus</i>
Species	<i>vannamei</i>

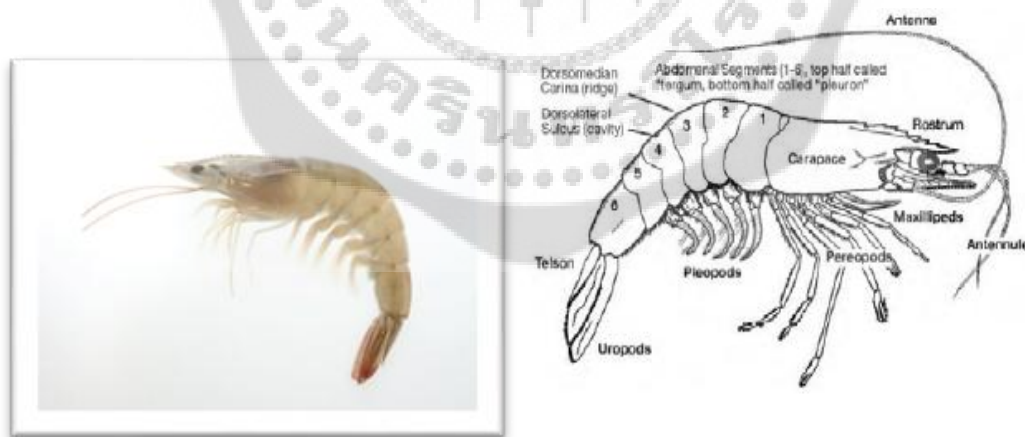
กุ้งขาว *Penaeus vannamei* หรือที่เรียกกันว่า "กุ้งขาว หรือ กุ้งแวนนาไม" นั้นค้นพบโดย เบน (Boone, 1931: 173) ในปี ค.ศ. 1931 มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Penaeus vannamei* ส่วนชื่อสามัญที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ใช้อยู่คือ white leg shrimp เป็นกุ้งพื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออกจากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู (Holthuis, 1980: 152-271; Rosenberry, 1998: 164) เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้ที่ระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต มีพื้นที่ท้องทะเลเป็นโคลน (muddy bottom) ที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ กุ้งชนิดนี้มีการเลี้ยงกันมากในประเทศเอกวาดอร์ เม็กซิโก เปรู ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบีย และบราซิล กุ้งชนิดนี้เป็นกุ้งที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลาช้านาน ทำให้มีการนำเข้าไปเลี้ยงในหลาย ๆ ประเทศ

ทวีปเอเชียได้มีการนำกุ้งขาว *P. vannamei* มาเลี้ยงครั้งแรกในปี 1996 ที่ประเทศไต้หวัน ส่วนประเทศไทยได้มีเกษตรกรทำการลักลอบนำกุ้งชนิดนี้จากประเทศไต้หวันเข้ามาทดลองเลี้ยงในปี 1997 แต่การทดลองเลี้ยงในครั้งนั้นไม่ประสบผลสำเร็จ จนกระทั่งในปี 2002 กรมประมงได้อนุญาตให้นำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาว *P. vannamei* ที่ปลอดเชื้อ (Specific Pathogen Free; SPF) ตามระเบียบของกรมประมงเข้ามาทดลองเลี้ยงในประเทศไทย (มาลินี วิชชาวุธ; และ สมยศ สิทธิจิตต์, 2548: 170-171) เนื่องจากในขณะนั้นการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ในประเทศไทยกำลังประสบปัญหากุ้งโตช้าทำให้เกษตรกรจำนวนมากขาดทุน (ชลอ ลี้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันท์

รัชชกุล. 2547: ไม่ปรากฏเลขหน้า) ในเวลาต่อมาเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงเปลี่ยนมาเลี้ยงกุ้งขาว *P. vannamei* กันมากขึ้น

ลักษณะทั่วไป

ลักษณะทั่วไปของกุ้งขาว *P. vannamei* คือลำตัวมีสีขาว มี 8 ปล้อง ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรืออยู่ในระดับยาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือก หัวสั้นกริสุง ปลายกริแคบ ส่วนของกริมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กริด้านบนมี 8 ฟัน กริด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกริมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวมีสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดินมีสีขาวเป็นลักษณะที่โดดเด่น หนวดแดงยาว 2 เส้น ตาสีแดงเข้ม ส่วนตัวมี 6 ปล้อง เปลือกตัวบางสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ โดยที่ปลายมีสีแดงและข้างในมีสีขาว ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้มแพนหางมี 4 ใบและ 1 กริหาง ขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มตัวของกุ้งสายพันธุ์นี้จะมีขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ กุ้งขาวหากินทุกระดับความลึกของน้ำ ชอบว่ายล่องน้ำแก่ง ลอกคราบเร็ว ทุกๆ สัปดาห์ไม่หมกตัว ชอบน้ำกระด้างที่มีความกระด้างรวม 120 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าอัลคาไลน์ในช่วง 80-150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของน้ำในบ่อเลี้ยง ตื่นตกใจง่าย เป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งในระบบธรรมชาติ และระบบกึ่งหนาแน่นโดยมีระดับน้ำประมาณ 1.0 -1.5 เมตร (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์. 2545: 121-124) (ภาพประกอบ 1)

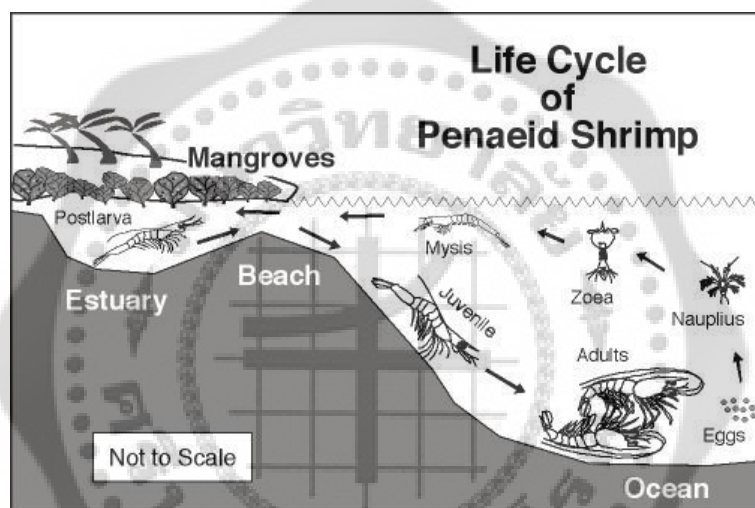


ภาพประกอบ 1 แสดงลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งขาว *Penaeus vannamei* (ซ้าย), ภาพวาดแสดงลักษณะภายนอก (ขวา)

ที่มา: Rosenberry, B. (2005). *World Shrimp Farming*. In *Shrimp News International*. (online)

วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

ในธรรมชาติกุ้งขาวจะมีอายุประมาณ 36 เดือน โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-60 มิลลิเมตรใกล้พื้นทราย ปกติแล้วแม่กุ้งขนาด 60-120 กรัม จะวางไข่ประมาณ 150,000-250,000 ฟอง ส่วนแม่กุ้งขนาด 30-45 กรัม จะวางไข่ประมาณไม่เกิน 100,000 ฟอง โดยจะวางไข่ในตอนกลางคืน แม่กุ้งจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วอยู่ประมาณ 45-60 วินาที แล้วจึงเริ่มออกไข่ขณะที่ลดความเร็วลงอย่างช้าๆ ปกติแล้วการผสมพันธุ์ของกุ้งขาวจะผสมพันธุ์ในเวลากลางวัน หลังจากมีการลอกคราบของตัวเมีย และผสมพันธุ์กันที่ความลึก 10-15 เมตร ถึง 30-50 เมตร ในธรรมชาติแม่กุ้งที่มีไข่แก่พร้อมที่จะวางไข่นั้น จะสังเกตได้จากรังไข่เป็นลำที่มีสีเขียวเกือบดำอยู่บนแถบหลังของลำตัวทั้งสองข้าง (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์, 2545: 121-124) (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 วงจรชีวิตของกุ้งขาว *Penaeus vannamei*

ที่มา: Rosenberry, B. (2005). *World Shrimp Farming*. In *Shrimp News International*. (online)

ขั้นตอนการพัฒนาของตัวอ่อน

ตัวอ่อนของกุ้งขาว *Penaeus vannamei* จะมีการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงของการลอกคราบ โดยไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีลักษณะกลม มีเมือกห่อหุ้ม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.22 มิลลิเมตร ไข่กุ้งจะฟักเป็นตัวในบริเวณที่วางไข่ จากนั้นลูกกุ้งวัยอ่อนจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่บริเวณชายฝั่งในย่านน้ำกร่อย ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอาหารธรรมชาติสมบูรณ์ ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวเองอยู่บริเวณนี้จนโตจนถึงขั้นพ่อแม่พันธุ์ แล้วจึงค่อยอพยพสู่ทะเลลึกเพื่อทำการสืบพันธุ์ และวางไข่ต่อไป ในการพัฒนาตัวอ่อนระยะของกุ้งขาว เมื่อไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วภายใน 12-14 ชั่วโมง ก็ จะฟักเป็นตัวอ่อนในระยะ nauplius สำหรับลูกกุ้งที่ฟักออกมาเป็นตัวนี้จะมีการพัฒนาและ

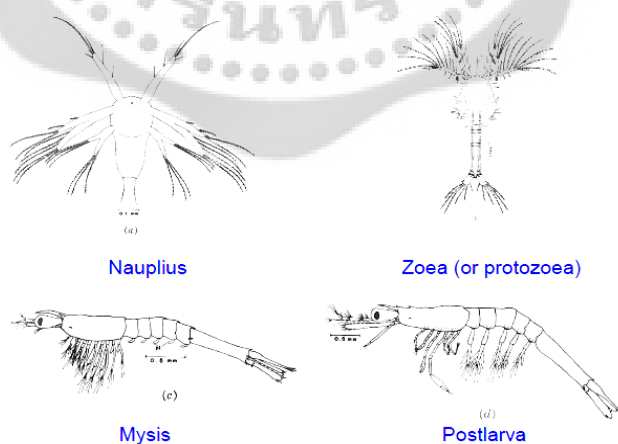
เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจนกระทั่งเหมือนตัวเต็มวัย ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นระยะต่างๆได้ดังต่อไปนี้ (ภาพประกอบ 3)

1. ตัวอ่อนระยะที่ 1 นอเพียส (nauplius) มีรูปร่างคล้ายแมงมุม ยังไม่ต้องการอาหาร เนื่องจากมีถุงอาหาร (yolk sac) ติดอยู่กับลำตัว ตัวอ่อนในระยะนี้จะผ่านการลอกคราบ 5-6 ครั้ง ภายในเวลา 36-48 ชั่วโมง ก่อนจะเข้าสู่ระยะที่ 2

2. ตัวอ่อนระยะที่ 2 โปรโตซุเอีย (protozoa) ตัวอ่อนระยะนี้จะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวและลำตัวจะแยกจากกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง 3 ขั้นตอน ใช้ระยะเวลาประมาณ 4-7 วัน

3. ตัวอ่อนระยะที่ 3 ไมซิส (mysis) ลูกกุ้งระยะนี้จะมีลักษณะคล้ายลูกกุ้งวัยรุ่น แต่ยังมีว่ายน้ำแบบหัวที่มลงและติดขึ้นลง พัฒนาการของลูกกุ้งระยะนี้มี 3 ขั้นตอน ใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน

4. ตัวอ่อนระยะที่ 4 โปสลาวา (post larva) ลูกกุ้งระยะนี้จะมีลักษณะใกล้เคียงกับลูกกุ้งวัยรุ่นมากขึ้น มีอวัยวะต่างๆ เกือบครบทุกส่วน และพัฒนาการไปเรื่อยๆ จนเข้าสู่ระยะกุ้งวัยรุ่น ลูกกุ้งในระยะโปสลาวา (post larva) นี้จะมีขาเดิน 3 คู่ คู่แรกมองเห็นเป็นก้ามชัดเจน หางแคบเข้าเป็นระยะที่มีระยางค์ครบ มีขากรรไกร (mandible) ที่ชัดเจน ขาว่ายน้ำเจริญให้เห็นชัดเจนขึ้น กริมีขนาดสั้นกว่าดวงตา ระยะระหว่างตากางออกมองเห็นได้ชัดเจน ลักษณะลำตัวสั้นมีลักษณะใส มีเส้นสีน้ำตาลพาดยาวจากบริเวณหนวดถึงหาง โดยปล้องท้องปล้องที่ 6 จะยาวกว่าปล้องหัวเล็กน้อย ในระยะกุ้งวัยรุ่น (juvenile) ลูกกุ้งจะมีขนาดตัวโตขึ้น โดยมีการเจริญของเหงือกที่สมบูรณ์ กุ้งในระยะนี้จะมีการพัฒนาของกรืออย่างเต็มที่ มองเห็นกริด้านบนมี 8-9 พับ และกริด้านล่างมี 1-2 พับ ความยาวกริจะสั้นกว่า exopodite ของหนวด ปลายกริเรียวยาวตรง การเคลื่อนไหวจะคล้ายกับกุ้งที่โตเต็มที่แล้ว คือ ใช้ขาเดินและขาว่ายน้ำ (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์, 2545: 121-124)



ภาพประกอบ 3 แสดงกุ้งวัยอ่อนของกุ้งขาวในระยะต่างๆ

ที่มา: ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ. (2551). คู่มือการตรวจและวินิจฉัยโรคในกุ้งทะเล. ในวารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. หน้า 81-126.

โรคในกุ้งขาว

โรคที่เกิดกับกุ้งขาวเป็นผลของความสัมพันธ์ระหว่างกุ้ง สภาพแวดล้อม และเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆ ดังนั้นเมื่อปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งมีอิทธิพลเพิ่มมากขึ้น เช่น ความรุนแรงของเชื้อก่อโรค การปรากฏของเชื้อก่อโรคหลายๆ ชนิด สภาพแวดล้อมในการเลี้ยง หรือภาวะทางโภชนาการที่ไม่เหมาะสม ส่งผลทำให้การก่อโรคหรือความรุนแรงของโรคขยายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (Snieszko. 1973: 201-220)

โรคที่เกิดกับกุ้งขาวที่ทำการเพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ 1) โรคไม่ติดเชื้อ และ 2) โรคติดเชื้อ สำหรับโรคไม่ติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับกุ้งมักมีสาเหตุมาจากภาวะแวดล้อมในบ่อเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ภาวะทางโภชนาการ สารพิษ และความเครียด (Bachere. 2000: 3-11) ส่วนโรคติดเชื่อนั้นเป็นสาเหตุหลักสำคัญ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โรคติดเชื้อในกุ้งที่สำคัญมักเกิดจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ ซึ่งการติดเชื้อไวรัส และแบคทีเรียได้สร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทย และประเทศอื่นๆ อย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57-112)

เชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อโรคในกุ้ง ได้แก่

1. Taura syndrome virus (TSV) พบครั้งแรกในปี 1991 ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวใกล้กับแม่น้ำทอรา ในประเทศเอกวาดอร์ ไวรัสนี้ทำให้เกิดกุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 75 - 80% ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง สร้างความเสียหายให้กุ้งขาวในทวีปอเมริกาได้กว่า 100 ล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐ (Lightner; et al. 1995: 1-12) ในปี 2003 ได้พบการระบาดของโรคนี้เป็นครั้งแรกในกุ้งขาวที่เลี้ยงในภาคกลางของประเทศไทย ต่อมาในช่วงต้นปี 2004 มีการตรวจพบโรคนี้ในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้มีรายงานการตรวจพบเชื้อนี้ในกุ้งชนิดอื่นได้ด้วย เช่น *P. stylirostris*, *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. merguensis* (กุ้งแชบ๊วย), *P. monodon* (กุ้งกุลาดำ) ด้วยเหตุที่นี้มีความร้ายแรงและแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว โรคนี้มักเกิดในกุ้งขาววัยอ่อนและกุ้งวัยรุ่นในกุ้งที่มีอายุ 14-40 วันหลังจากปล่อยเลี้ยง กุ้งป่วยบริเวณหางมีสีแดงชัดเจน ถ้าเป็นมากลำตัวมีสีแดงเปลือกนึ่ม เชื่องซึม กุ้งจะตายมากในช่วงลอกคราบ โดยมีอัตราการตาย 40-90% ถ้ากุ้งรอดตายจากการติดเชื้อจะปรากฏรอยแผลสีดำที่เปลือก (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ. 2551: 81-126)

2. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) เป็นไวรัสสำคัญอีกตัวหนึ่งในกุ้งขาว พบครั้งแรกที่เกาะฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1981 โดยการระบาดครั้งนั้นทำให้กุ้งตายมากกว่า 90% (Lightner; et al. 1992: 97-105) พบการระบาดของโรคนี้ในไทยเป็นครั้งแรกในปี 2003 (ชลอ ลิ้มสุวรรณ; และพรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547: ไม่ปรากฏเลขหน้า) โรคนี้ทำให้กุ้งขาวมีอัตราการตายสูงภายในเวลารวดเร็ว ก่อให้เกิดผลเสียหายรุนแรง เช่นเดียวกับในกุ้งกุลาดำ ไวรัสนี้ทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งหยุดชะงัก ส่งผลให้อัตราการ

เจริญเติบโตของกุ้งลดลง ทำให้กุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แดกไซส์ ผิดขนาด และคัดแยกไซส์ลำบาก ทำให้ขายไม่ได้ราคา (Mari; et al. 1993: 2637-2643)

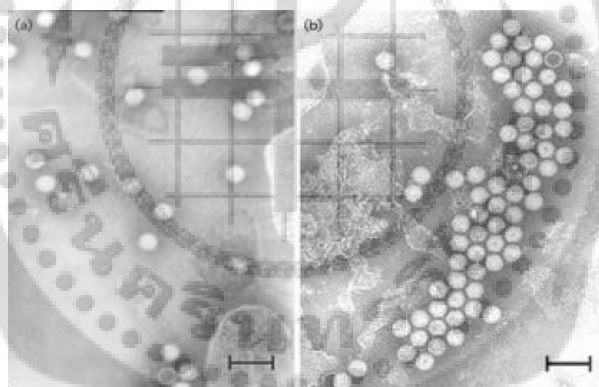
3. White spot syndrome virus (WSSV) โรคนี้ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมากถึงหนึ่งหมื่นล้านดอลลาร์สหรัฐฯ นับตั้งแต่ปี 1993 เป็นต้นมา สามารถพบได้แทบทุกภูมิภาค และในหลายประเทศ รวมถึงประเทศไทยก็พบโรคนี้เช่นกัน (Wang; et al. 2000: 91-104) ก่อให้เกิดโรคดวงขาว ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญที่สุดในกุ้งขาว กุ้งที่ติดเชื้อโรคนี้พบลักษณะอาการคือ ลำตัวกุ้งมีสีแดง มีดวงขาวบริเวณผิวใต้เปลือกขนาด 1-2 มิลลิเมตร บริเวณส่วนหัวและลำตัวกุ้ง มีอัตราการตายสูงมากถึง 40-100% ภายใน 5-10 วัน (Lightner. 1999: 27-52)

4. Yellow head virus (YHV) เป็นโรคสำคัญของกุ้งขาวในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบได้ในหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียตะวันออก อินโดแปซิฟิก และออสเตรเลีย เป็นโรคที่มีผลกระทบต่อการค้ากุ้งและการขนย้ายกุ้งระหว่างประเทศ โรคนี้ทำให้เกิดการตายในกุ้งรุนแรงและเฉียบพลัน โดยประมาณกันว่าทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจมากถึง 500 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ พบครั้งแรกที่ประเทศไทย ในราวปี 1991 หลังจากนั้นก็พบในอีกหลายประเทศในทวีปเอเชีย ก่อให้เกิดโรคหัวเหลือง ทำให้เกิดการตายในกุ้งอย่างรุนแรง กุ้งติดเชื้อที่มีอาการคือ ลำตัวกุ้งสีซีด เหงือก ตับและตับอ่อนมีสีเหลืองเห็นชัดเจน กุ้งกินอาหารเพิ่มมากผิดปกติ จากนั้นจะเริ่มกินลดลง กุ้งเริ่มแสดงอาการหัวเหลือง และตายเร็วมากภายใน 3-5 วัน (ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ. 2551: 81-126)

5. Infectious myonecrosis virus (IMNV) ก่อให้เกิดโรค Infectious myonecrosis (IMN) พบครั้งแรกที่ประเทศบราซิลในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศบราซิลเป็นอย่างมาก ทวีปเอเชียพบครั้งแรกในปี 2006 ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาวที่ประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งก็ทำให้เกิดความเสียหายมากเช่นกัน ไวรัสนี้ในธรรมชาติสามารถพบได้ในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* แต่มีรายงานการวิจัยพบว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถก่อโรคได้ในกุ้งสปีชีส์อื่นๆ ได้แก่ *L. stylirostris*, *P. monodon* และ *Farfantepenaeus subtilis* (Tang et al., 2005: 261-265) อาการโรคนี้เป็นโรคที่ค่อยๆ แสดงอาการทีละน้อย มีอัตราการตายต่ำ แต่อัตราการตายสะสมเมื่อจับกุ้งอายุสูงถึง 70 % กุ้งจะเริ่มแสดงอาการหลังติดเชื้อประมาณ 7 วัน และอาการจะคงอยู่ตลอดช่วงการเลี้ยง อาการที่สำคัญ คือ กล้ามเนื้อโดยเฉพาะที่บริเวณส่วนท้องและหางมีสีขาว สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า คือ กล้ามเนื้อโดยเฉพาะที่ส่วนท้องและหางมีสีขาวขุ่น (white และ opaque appearance) เมื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าเกิดจากการตายของกล้ามเนื้อลาย (focal ถึง extensive coagulative hyaline myonecrosis) ร่วมกับการติดสีแดงมากขึ้น (increased eosinophilia) และการแตกหักของเส้นใยกล้ามเนื้อ (fragmentation of muscle fibers) และการบวมหน้า (edema) และที่อวัยวะลิมโฟออยด์ยังพบ lymphoid organ (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72)

Infectious Myonecrosis Virus (IMNV)

Infectious myonecrosis virus (IMNV) เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค Infectious myonecrosis (IMN) พบไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งขาว *P. vannamei* ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในปี 2002 (Lightner; et al. 2004: 85) ต่อมาในปี 2006 มีรายงานการเกิดโรค IMN ในกุ้งขาว *P. vannamei* ที่ประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งไวรัสชนิดนี้ได้สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งของอินโดนีเซียเป็นอย่างมาก จากรายงานการวิจัยพบว่า เมื่อทำ genome sequencing ของเชื้อ IMNV ที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งที่ประเทศอินโดนีเซียเปรียบเทียบกับเชื้อ IMNV ที่พบในประเทศไทย พบว่ามีความคล้ายคลึงกันถึง 99.6% ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่เคยมีรายงานการระบาดในประเทศไทยแถบเอเชียมาก่อน จึงสันนิษฐานว่าการติดเชื้อ IMNV ในประเทศอินโดนีเซีย นั้น น่าจะเกิดจากการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่ติดเชื้อ IMNV จากประเทศไทย (Senapin; et al. 2007: 32-38) Infectious myonecrosis virus (IMNV) จัดเป็น non-enveloped virus และมี capsid แบบ icosahedral (ภาพประกอบ 4) มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 40 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded RNA (dsRNA) ขนาดจีโนม 7560 bp (GenBank AY570982) จัดอยู่ในกลุ่ม Totivirus อยู่ใกล้กับสกุล Giardiavirus (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72)

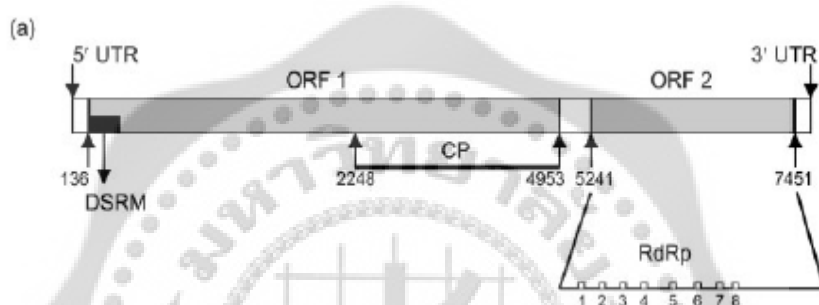


ภาพประกอบ 4 แสดงลักษณะอนุภาคของเชื้อ IMNV ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (หน่วยวัด, 100 นาโนเมตร)

ที่มา : Poulos, B.T.; & Lightner, D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Disease of Aquatic Organisms*. 73: 69-72.

จีโนมของ IMNV

เชื้อ IMNV มีสารพันธุกรรมเป็น double-stranded RNA (dsRNA) มีขนาดจีโนม 7560 bp ประกอบด้วย 2 open reading frames (ORFs) ที่ไม่ซ้อนทับกัน คือ ORF1 อยู่ทางด้านปลาย 5' ที่เบสตำแหน่ง 136-4953 ซึ่งเป็นรหัสสำหรับการแสดงออกของ RNA-binding protein และ capsid protein โดย RNA-binding protein จะอยู่ครึ่งแรกของ ORF1 และ capsid protein จะอยู่ครึ่งหลังของ ORF1 โดยเริ่มที่ตำแหน่งเบส 2248-4953 ส่วน ORF2 อยู่ทางด้านปลาย 3' ที่ตำแหน่งเบส 5241-7451 ซึ่งเป็นรหัสสำหรับการแสดงออกของ RNA dependent RNA polymerase (RdRp) (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72) (ภาพประกอบ 5)

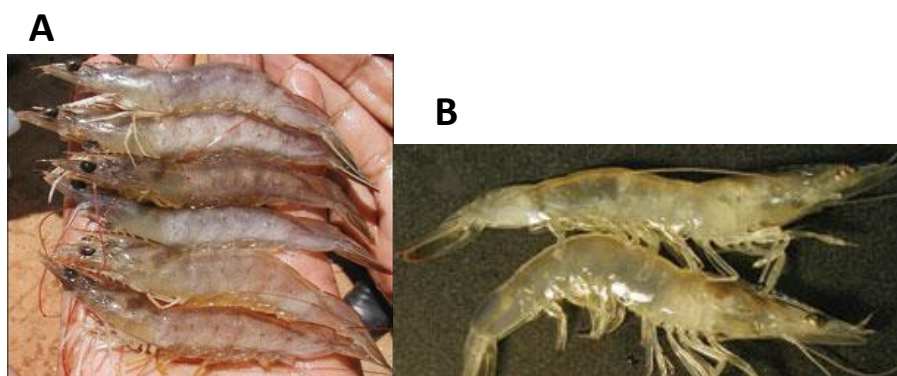


ภาพประกอบ 5 แสดงจีโนมของ IMNV

ที่มา: Poulos; et al. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*. 87: 987-996.

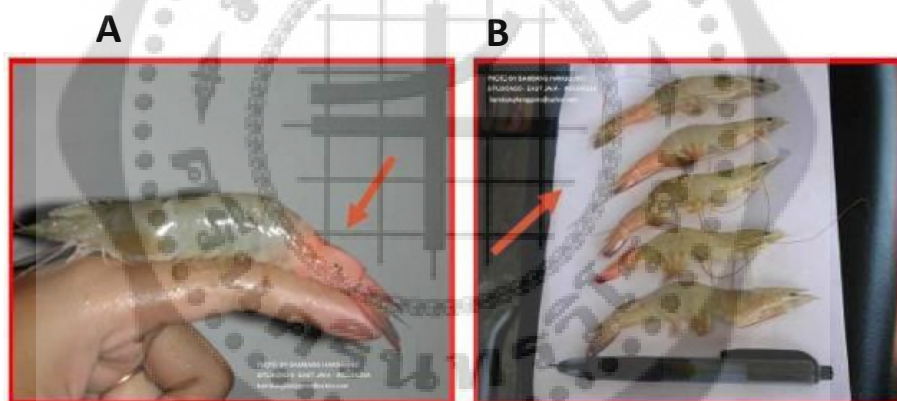
อาการของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV

กุ้งที่ติดเชื้อ IMNV กล้ามเนื้อจะมีลักษณะสีขาวขุ่นบริเวณปล้องสุดท้ายของลำตัวที่ติดกับแพนหาง เซลล์กล้ามเนื้อเกิดการตาย (necrosis) และอาจพบกุ้งบางตัวมีลักษณะของกล้ามเนื้อเป็นสีส้มคล้ายกุ้งต้ม (ภาพประกอบ 6 และ 7) กุ้งที่ติดเชื้อจะมีอัตราการตายไม่สูงมาก แต่จะทยอยตายเรื่อยๆติดต่อกันเป็นเวลาหลายวัน อาจมีการตายสะสมมากถึง 70% (Lightner; et al. 2004: 85 ; Poulos; & Lightner. 2006: 69-72) สำหรับอาการป่วยและอัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV ค่อนข้างรวดเร็วหากมีปัจจัยอื่นที่ทำให้กุ้งเกิดความเครียดร่วมด้วย เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็ม และการได้รับอาหารที่คุณภาพต่ำ เป็นต้น



ภาพประกอบ 6 (A) และ (B) กุ้งขาวติดเชื้อ IMNV แสดงกล้ามเนื้อที่มีลักษณะสีขาวขุ่น

ที่มา: ชัยวุฒิ สุตทองคง. (2550). โรคกล้ามเนื้อตายจากการติดเชื้อ IMNV. ในวารสาร ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรศาสตร์. หน้า 1-5.



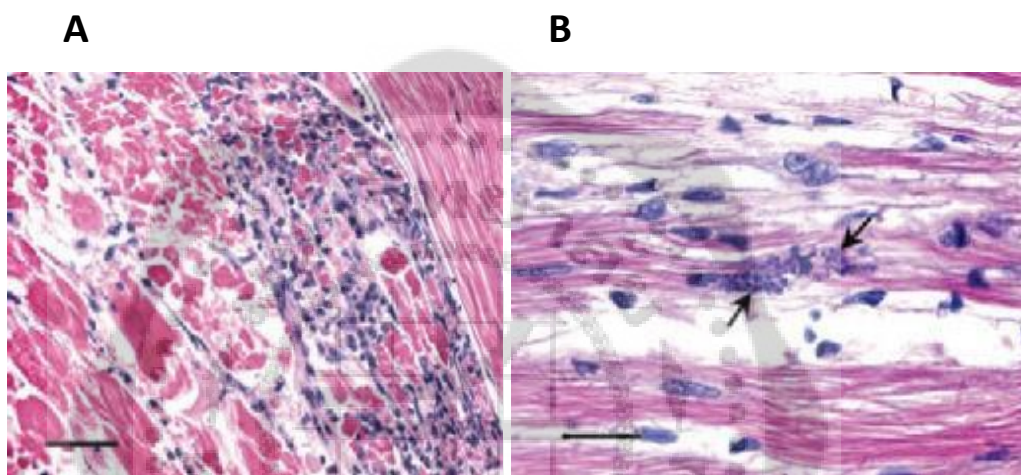
ภาพประกอบ 7 (A) และ (B) กุ้งขาวที่มีการติดเชื้อ IMNV กล้ามเนื้อส่วนหางเป็นสีขาวขุ่นและเปลี่ยนเป็นสีส้มคล้ายกุ้งต้มสุก (ลูกศรชี้)

ที่มา: ชัยวุฒิ สุตทองคง. (2550). โรคกล้ามเนื้อตายจากการติดเชื้อ IMNV. ในวารสาร ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรศาสตร์. หน้า 1-5.

พยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV

จากการตรวจสอบเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV โดยการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin พบการตายของเซลล์กล้ามเนื้อ (myonecrosis) โดยเฉพาะบริเวณเส้นใย

กล้ามเนื้อลาย (striated muscle fibers) (ภาพประกอบ 8) ซึ่งเป็นลักษณะการตายที่เกิดจากการขาดเลือด (coagulative necrosis) รูปร่างและโครงสร้างเซลล์ยังคงเดิมแต่นิวเคลียสหายไป บางครั้งมีการบวมน้ำ (edema) แทรกกระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ กุ้งที่มีอาการรุนแรงจะพบการตายของกล้ามเนื้อที่รุนแรงขึ้น กล้ามเนื้อจะมีลักษณะคล้ายของเหลว (liquefactive necrosis) ไม่มีรูปร่างเดิมของเซลล์เหลืออยู่เลย ถ้าโรคมมีการพัฒนาต่อไปเม็ดเลือดที่บริเวณเส้นใยกล้ามเนื้อที่อักเสบจะถูกแทนที่ด้วย fibrocyte (เป็นเซลล์ที่จำเป็นต่อการชดเชยเซลล์ที่ตายไป) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมีเม็ดเลือดแทรกกระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อที่สร้างขึ้นมาใหม่ (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72)



ภาพประกอบ 8 แสดงลักษณะการตายของกล้ามเนื้อที่ติดเชื้อ IMNV หลังการย้อมเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E); (ก) เนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV เกิดการรวมกลุ่มกันของกล้ามเนื้อที่ตายในลักษณะ coagulative necrosis ของกล้ามเนื้อลำตัว รวมถึง haemocytic infiltration และ fibrosis (มุมมองด้านขวาคือกล้ามเนื้อปกติ) (หน่วยวัด, 50 ไมโครเมตร); (ข) พบ basophilic inclusion รอบๆ นิวเคลียสของกล้ามเนื้อลาย (หน่วยวัด, 20 ไมโครเมตร)

ที่มา: Poulos; et al. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*. 87: 987-996.

อาการที่เด่นชัดอีกอย่างหนึ่งของกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV คือต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) จะมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งปกติ 3-4 เท่า ลักษณะของ lymphoid ที่ขยายใหญ่ขึ้น (hypertrophy) เนื่องจากการสะสมของ lymphoid organ spheroids (LOS) ซึ่งจะพบในกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV ทั้งระยะเฉียบพลันและเรื้อรัง นอกจากนี้บ่อยครั้งที่พบการสะสมของ LOS ในอวัยวะอื่นที่ไม่ได้อยู่ใกล้

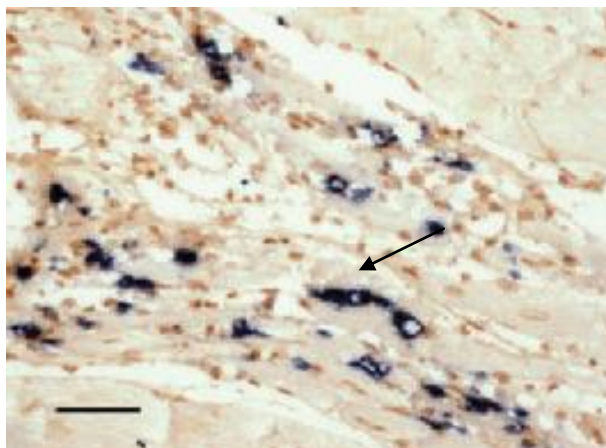
lymphoid เช่น เหงือก หัวใจ รวมทั้งเส้นประสาทด้านหลัง (ventral nerve cord) (Lightner; et al. 2004: 85; Poulos; & Lightner. 2006: 69-72)

การตรวจการติดเชื้อ IMNV

ในการตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งอาจใช้การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น โดยดูด้วยตาเปล่า สังเกตอาการ และพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป รวมถึงอัตราการตายของกุ้ง แต่การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นมีโอกาสผิดพลาดสูงเนื่องจากอาการของกล้ามเนื้อขาวขุ่นนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ความเครียด การขาดออกซิเจน อุณหภูมิและความเค็มของน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหัน สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การติดเชื้อปรสิตพวก Microsporidian การติดเชื้อ *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV) หรืออาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. และ *Aeromonas* sp. เป็นต้น (ชัยวุฒิ สุดคงทอง; และ ชิตาพร ฉวีภักดิ์. 2550: 6-7)

ดังนั้นจึงควรใช้วิธีการตรวจที่แน่นอนและมีความถูกต้องมากกว่า เพื่อจะได้วิเคราะห์ผลไม่ผิดพลาด อาจใช้การตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยวิธี immunohistochemistry โดยการย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin ซึ่งวิธีนี้ก็สามารตรวจการติดเชื้อ IMNV ได้ถูกต้อง แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้เวลาในการเตรียมเนื้อเยื่อกุ้ง และไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อในระยะแรกได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนานำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจการติดเชื้อ IMNV ซึ่งจะให้ผลการตรวจที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่าวิธีอื่นๆ

แทงค์ และคนอื่นๆ (Tang; et al. 2005: 11-21) ได้นำเทคนิค *in situ* hybridization (ISH) มาใช้ตรวจหาเชื้อ IMNV ในกุ้งขาว โดยมีการออกแบบ DNA probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ IMNV คือ IMNV-317 ที่มีการติดฉลากด้วย digoxigenin 11-dUTP (digoxigenin-labelled IMNV probe) พบว่า ในเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อที่บริเวณตับ, ตับอ่อน (hepatopancreas) และหัวใจ มีปฏิกิริยา ISH เกิดขึ้น ทำให้เกิดเป็นตะกอนสีดำซึ่งเกิดจากการจับกันของ probe และเชื้อ IMNV ที่บริเวณเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ เทคนิคนี้มีความแม่นยำสูง แต่มีความไวต่ำ ขั้นตอนการทำที่ยุงยากและค่อนข้างใช้เวลา (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 9 การใช้เทคนิค *in situ* hybridization ในการตรวจหาเชื้อ IMNV ในกล้ามเนื้อลายของ กุ้งที่ติดเชื้อ IMNV โดยใช้ digoxigenin-labeled IMNV probe ซึ่งบริเวณที่ probe จับจะเห็น เป็นตะกอนสีดํา (หน่วยวัด, 50 ไมโครเมตร)

ที่มา: Poulos; et al. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*. 87: 987-996.

พอลล์ และไลน์เนอร์ (Poulos; & Lightner. 2006: 69-72) ได้พัฒนาการตรวจเชื้อ IMNV โดยใช้เทคนิค RT-PCR และ nested RT-PCR ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ RNA dependent RNA polymerase (RdRp) gene โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะต่อ IMNV มาทำ PCR 2 รอบ ในปฏิกิริยา PCR รอบแรก (1° PCR) มีการออกแบบไพรเมอร์ให้ได้ PCR product ขนาด 328 bp จากนั้นนำ PCR product ของ 1° PCR มาทำเป็น template เพื่อทำปฏิกิริยา PCR รอบที่สอง (2° PCR) และออกแบบไพรเมอร์ให้ได้ PCR product ขนาด 139 bp จากผลการทดลองพบว่า ในปฏิกิริยา 1° PCR สามารถตรวจการหาเชื้อ IMNV ได้เมื่อมีปริมาณ RNA 100 copies number ส่วนปฏิกิริยา 2° PCR สามารถตรวจหาเชื้อได้เมื่อมีปริมาณ RNA 10 copies number แสดงว่า เทคนิคนี้มีความรวดเร็ว และมีความไวในการตรวจสอบสูง

ต่อมา แอนเดรล และคนอื่นๆ (Andrade; et al. 2007: 9-15) ได้พัฒนาการตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งขาว ด้วยเทคนิค real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) เทคนิคนี้อาศัยหลักการของ PCR ในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย โดยใช้ TaqMan probe ในการวิเคราะห์หาปริมาณ PCR product ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR จากการทดลองพบว่าเทคนิค real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อ IMNV ได้เมื่อมีปริมาณของไวรัส 1500 copies number ขึ้นไป ในขณะที่เทคนิค nested RT-PCR สามารถตรวจการติดเชื้อ IMNV ได้เมื่อมีปริมาณไวรัสเพียง 10 copies number

เทสซีรา-โลเปซ และคนอื่นๆ (Teixeira-Lopes; et al. 2011: 212-216) ได้ทำการศึกษากุ้งขาว *P. vannamei* ในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งของประเทศบราซิล โดยใช้เทคนิค RT-PCR และ quantitative real time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) และ Infectious myonecrosis virus (IMNV) ซึ่งไวรัสทั้งสองชนิดนี้ได้ก่อให้เกิดความเสียหายมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งของประเทศบราซิล จากการทดลองพบว่า ตัวอย่างกุ้งขาวที่นำมาตรวจใช้ตรวจการติดเชื้อทั้ง IHHNV และ IMNV ให้ผลบวกในทุกตัวอย่าง แสดงว่า กุ้งที่นำมาทดลองมีการติดเชื้อทั้ง IHHNV และ IMNV ร่วมกัน

พุทรวินบูลย์ และคนอื่นๆ (Puthawibool; et al. 2009: 27-31) ได้มีการพัฒนาการตรวจการติดเชื้อ IMNV โดยใช้เทคนิค reverse-transcriptase loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) มีการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ RNA dependent RNA polymerase (RdRp) gene ของ IMNV จากรายงานการวิจัยพบว่าเทคนิค RT-LAMP นี้สามารถตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งได้ แม้ว่าจะมีปริมาณของไวรัสเพียง 2 copies number เท่านั้น อีกทั้งเทคนิคยังใช้เวลาในการตรวจการติดเชื้อน้อยกว่าเทคนิค *in situ* hybridization, RT-PCR และ real-time PCR

นอกจากไวรัสจะก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวแล้ว ยังพบว่าแบคทีเรียก็สามารถทำให้เกิดโรคในกุ้งขาวได้เช่นกัน โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* เช่น *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* เป็นต้น ล้วนเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรควิบริโอซิส (Vibriosis) ทั้งสิ้น

เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในกุ้งขาว ได้แก่

1. ***Vibrio parahaemolyticus*** มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) หรือโค้ง (curve) มีขนาดความกว้าง 0.4-0.5 และความยาว 1-3 ไมโครเมตร จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ (NaCl) 1-8 % เจริญได้ดีในช่วงค่า pH 7.6- 9 เป็นเชื้อที่ไม่ทนความร้อนสามารถทำลายได้ด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurization) และถูกทำลายได้ด้วยกรดที่มีค่า pH ต่ำกว่า 4.5 สามารถพบเชื้อได้ทั่วไปตามแนวชายฝั่งทะเล ในตะกอนดิน และในน้ำทะเล และสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปู เป็นต้น *V. parahaemolyticus* ทำให้กุ้งขาว *P. vannamei* มีอาการ คือกินอาหารได้น้อยลง ตับ และตับอ่อนผิดปกติ สีเนื้อจะขุ่น ลำตัวสกปรก และมีตะกอนเกาะตามผิว เมื่อนำตับและตับอ่อนมาทำการเพาะเชื้อจะพบเชื้อเป็นจำนวนมาก หากปล่อยไว้นานอาการจะรุนแรงและกุ้งอาจตายได้ (Robert-Pillot; et al. 2010: 190-197).

2. ***Vibrio harveyi*** มีลักษณะเป็นท่อน สามารถเจริญได้ดีในช่วง pH 6-9 และเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20- 50 °C เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) เจริญในอาหารที่มีเกลือ (NaCl) 1.6 % สามารถพบเชื้อแบคทีเรียนี้ปะปนอยู่ในน้ำทะเล ปากแม่น้ำ ชายฝั่ง ดินตะกอน และสัตว์ทะเล เชื้อ *V. harveyi* สามารถก่อให้เกิดโรคในกุ้งขาวได้ ถ้ามีเชื้ออยู่ในปริมาณที่มาก กุ้งที่ติดเชื้อนี้จะมีอาการ ลอยตามขอบบ่อ ไม่กินอาหาร สีลำตัวจะขุ่น ซีเหิงอกมีสีดำ ตับอักเสบ ตับอ่อนสี

ซีดลง อาจทำให้กุ้งเกิดโรคเรืองแสงในเวลากลางคืน โดยจะเห็นกุ้งเกิดการเรืองแสงมีแสงสีเขียวลอยขึ้นลงตามการเคลื่อนไหวของน้ำ ซึ่งอาจเป็นกุ้งที่ตายหรือใกล้ตาย โรคนี้สร้างความเสียหายอย่างมากต่อโรงเพาะฟัก และบ่อดิน (Thaithongnum; et al. 2006: 1-9)

3. *Vibrio vulnificus* มีรูปร่างเป็นท่อน เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ (NaCl) 1-2 % และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 °C สามารถพบเชื้อได้ทั่วไปในทะเล บริเวณปากแม่น้ำ และในสัตว์น้ำ ที่มีเปลือกแข็ง เช่น กุ้ง หอย และปู เชื้อ *V. vulnificus* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเสี้ยนดำในกุ้งขาว (black splint) กุ้งขาวที่เป็นโรคนี้จะมีการสะสมเม็ดสี (melanin) ที่บริเวณรอยต่อระหว่างเปลือกของแต่ละปล้องหรือบริเวณใต้แพนหาง บางตัวจะพบลักษณะเป็นเสี้ยนดำฝังลึกลงไปในกลุ่มเนื้อ เมื่อนำกุ้งไปต้มให้สุกจะเห็นเสี้ยนดำในกลุ่มเนื้อได้ชัดเจน (Dalsgaard; & Hoi. 1997: 1132-1135)

4. *Vibrio alginolyticus* มีรูปร่างเป็นท่อน เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล และสัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปู ปลา เป็นต้น กุ้งขาวที่ติดเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่พบว่าเกิด nodules จำนวนมากล้อมรอบบริเวณของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย โดยมีเม็ดเลือด (hemocyte) เข้ามารวมกลุ่มเพื่อกำจัดเซลล์ที่ถูกทำลายไป และมีการสะสมของเม็ดสี (melanization) บริเวณที่เกิดบาดแผล จึงอาจทำให้กุ้งตายได้ (Esteve; & Herrera. 2000: 1-5)

เรืองพันธ์ และคนอื่นๆ (Ruangpan; et al. 1995: 131-140) พบว่าสามารถแยกเชื้อ *V. alginolyticus* ได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยเสมอ และยังพบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ และสามารถตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ ใน ตับ ตับอ่อน และ hemolymph จากตัวอย่างกุ้งที่ป่วย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *V. alginolyticus* ยังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่ประเทศมาเลเซีย (Anderson; et al. 1988: 93-108) และกุ้งขาว *P. vannamei* ที่เลี้ยงในบ่ออนุบาล ในประเทศเอกวาดอร์ (Mohny; et.al. 1994: 116-125)

ส่วนการศึกษาของ อีสตีฟ และ เฮอเรรา (Esteve; & Herrera. 2000: 1-5) เกี่ยวกับการเลี้ยงกุ้งขาว *P. vannamei* ที่ประเทศเวเนซุเอลา พบว่าโรค Vibriosis ทำให้เกิดการตายมากที่สุดตั้งแต่ระยะ larval จนถึงกุ้งขนาดจับขายในบ่อดินเกิดจากเชื้อ *V. alginolyticus*

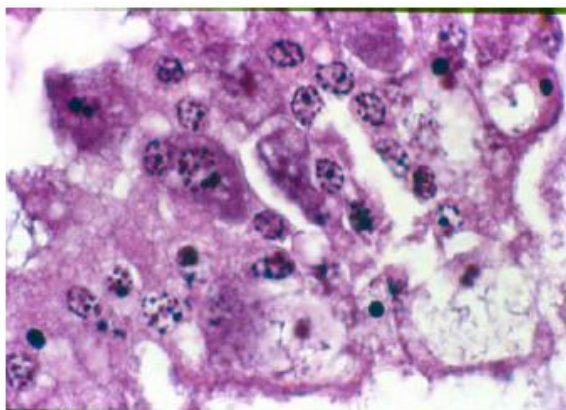
เลาหวินิจ และทรัพย์สินสุนทร (Lawhavit; & Sapsinsoonthon. 2005: 203-209) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียในพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาว *P. vannamei* ที่เลี้ยงในพื้นที่ที่มีระดับความเค็มต่ำจนถึงความเค็มน้ำปกติ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* อยู่ 4 ชนิด คือ *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*

อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ. 2536 ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่มีอาการป่วยเป็นโรค จากการทดลองพบเชื้อ *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. damsela*

Vibriosis

Vibriosis เป็นโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* (Chen; et al. 2000: 195-205) *Vibrio* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนโค้ง (curved rods) มีขนาดความกว้าง 0.5-0.8 ไมโครเมตร ความยาว 1.4-2.6 ไมโครเมตร (Inglis; et al. 1993: unpagged) ใช้แฟลกเจลลา (flagella) ในการเคลื่อนที่ สร้าง lateral flagella จำนวนมาก เจริญได้ทั้งในบริเวณที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ (facultative anaerobic) อยู่ในวงศ์ Vibrionaceae (Buamann et al. 1971: 268-294) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 18-37°C แต่ *V. parahaemolyticus* *V. alginolyticus* และ *V. cholera* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42°C แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* สามารถทนต่อความเป็นด่างได้ดีและเจริญได้ดีที่ pH ระหว่าง 7.4-9.6 แบคทีเรียในสกุล *Vibrio* เป็นสาเหตุของโรคกุ้งเกือบทุกชนิดที่พบในประเทศไทย จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม microflora สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและบ่อเลี้ยงกุ้ง (Sindermann. 1990: 41-74) แต่จะกลายเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogens) ทันทีที่กุ้งอ่อนแอ (Flegel. 1992: 57-112) และอาจพบร่วมกับเชื้อชนิดอื่นๆ เช่น รา ไวรัส เป็นต้น แต่บางครั้งก็เป็นสาเหตุของโรคเองด้วย (Costa; et al. 1998: 297-309) มีรายงานการตรวจพบแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ต่างๆ จากกุ้งที่เป็นโรค เช่น *V. parahaemolyticus* (Robert-Pillot; et al. 2010: 190-197) *V. harveyi* (Thaithongnum; et al. 2006: 1-9) และ *V. vulnificus* (Dalsgaard & Hoi. 1997: 1132-1135) เป็นต้น ลักษณะโดยทั่วไปของกุ้งขาวที่เป็นโรคนี้คือ กุ้งจะมีอาการอ่อนแอ ขึ้นมาเกยอยู่ตามบริเวณขอบบ่อหรือว่ายอยู่ผิวน้ำ เกิดการอักเสบเป็นลักษณะเนื้อตายตามอวัยวะต่างๆ เหงือกอักเสบ ตับอักเสบ พบจุดดำตามบริเวณเปลือก ติดเชื้อในกระแสเลือด และตายในที่สุด (Chen; et al.1992:195-205; Lightner.1996)

เมื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่กุ้งป่วย พบเชื้อ *Vibrio* ในตับและตับอ่อน พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิวในท่อตับ (ภาพประกอบ 10) และพบการรวมตัวของเม็ดเลือดเป็นกลุ่มกระจายอยู่ทั่วไป (generalized haemocytic nodules) ในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อ (Lightner. 1996) *V. alginolyticus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค Vibriosis (Lee; et al. 1996: 229-231) โดยพบว่ากุ้งขาวที่เกิดการติดเชื้อ *V. alginolyticus* มีลักษณะอ่อนแอ กินอาหารได้น้อยลง ว่ายน้ำไม่มีทิศทาง ลำตัวมีสีแดง กล้ามเนื้อจะมีสีขาวขุ่น ตับถูกทำลาย อาจก่อให้เกิดโรค Bacterial septicemia และก่อให้เกิดการตายต่อลูกกุ้งระยะต่าง ๆ (Esteve; & Herrera. 2000: 1-5)



ภาพประกอบ 10 แสดงการตายของเซลล์ตับและตับอ่อนของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อโรค Vibriosis

ที่มา: Lightner, D.V. (1996). *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Los Angeles, USA. unpagged.

Vibrio alginolyticus

V. alginolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นแท่งตรง ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในบริเวณที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศ (facultative anaerobic) เชื้อสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) ให้โคโลนีสีเหลือง เนื่องจากสามารถ ferment sucrose ได้ สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 10-40°C เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) สามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือ (NaCl) เข้มข้น 1-8% ให้ผลบวกกับการทดสอบ catalase, oxidation-fermentation, lysine decarboxylase, cytochrome oxidase (Liu et al., 2004: 23-28) มีความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycyclin hydrochloride, nalidixic acid, oxolinic acid และ oxytetracyclin แต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin, novobiocin, penicillin G, sulfisoxazol และ sulfonamide (Lee; et al. 1996: 229-231)

พบได้ทั่วไปในน้ำทะเล ในแหล่งพื้นที่ที่มีการเพาะเลี้ยงกุ้ง และพบได้ตามอวัยวะต่างๆ ของกุ้ง เป็น opportunistic pathogens ที่ก่อให้เกิดโรค Vibriosis ในกุ้ง ทำให้กุ้งตายเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Anderson; et al. 1988: 93-108; Lightner. 1988: 201-220; Lee; et al. 1996: 229-231) พบเชื้อ *V. alginolyticus* *V. parahaemolyticus* *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ในตับและตับอ่อน และน้ำเลือดของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ แสดงให้เห็นว่าพ่อแม่พันธุ์กุ้งอาจจะเป็นตัวแพร่เชื้อเข้าสู่โรงเพาะฟักลูกกุ้งได้ ซึ่งแบคทีเรียที่พบทั้งในพ่อแม่พันธุ์และในลูกกุ้งระยะต่าง ๆ น่าจะส่งผลไปถึงการเพาะเลี้ยงกุ้งในบ่อดิน (Ruangpan; et al. 1995: 131-140) มีรายงานว่าเชื้อ *V.*

alginoliticus เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่ประเทศมาเลเซีย (Anderson; et al. 1988: 93-108) และกุ้งขาวที่เลี้ยงในบ่ออนุบาล ในประเทศเอกวาดอร์ (Mohney; et al.1994: 116-125)

V. alginolyticus ทำให้กุ้งที่ตายมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่พบว่ามี การเกิด nodules จำนวนมากล้อมรอบบริเวณที่เนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย โดยมีเม็ดเลือด (hemocyte) เข้ามารวมกลุ่มเพื่อกำจัดเซลล์ที่ถูกทำลายและ มีการสะสมของเม็ดสี (melanization) บริเวณที่เกิด บาดแผล ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการเลี้ยงกุ้งขาว *P. vannamei* ที่ประเทศเวเนซุเอลา พบว่าโรค Vibriosis ทำให้เกิดการตายมากที่สุดตั้งแต่ระยะ larval จนถึงกุ้งขนาดจับขายในบ่อดิน เกิดจากเชื้อ *V. alginolyticus* ซึ่งจากการทดลองแช่กุ้งที่เชื้อ 5.2×10^7 CFU มิลลิลิตร⁻¹ เมื่อนำมาตัดเนื้อเยื่อ พบว่า เซลล์บุชั้นในของ digestive gland เซลล์แตกและหลุดออกและยังพบว่า ในเนื้อเยื่อของตัว อ่อนมีการจับกลุ่มเป็นก้อนของ hemocytes ซึ่งข้างในก้อนเป็นแบคทีเรียชนิดนี้รวมตัวกันอยู่ (Esteve; & Herrera. 2000: 1-5)

โกปอลล์ และคนอื่นๆ (Gopal; et al. 2005: 151-159) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ชนิดต่างๆ ในน้ำ, ตะกอน และในฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศอินเดีย พบว่าฟาร์มเพาะเลี้ยง กุ้งขาวในฝั่งตะวันตกมีแบคทีเรียสกุล *Vibrio* สูงกว่าฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งในฝั่งตะวันออก และตรวจพบ แบคทีเรีย *V. alginolyticus* ในปริมาณ 3-19 %, *V. parahaemolyticus* 2-13%, *V. harveyi* 1-7% และ *V. vulnificus* ในปริมาณ 1-4 % ของปริมาณแบคทีเรียที่พบทั้งหมด

ชัยวุฒิ สุตทองคง และคนอื่นๆ (2550: ไม่ปรากฏเลขหน้า) ได้ทำการศึกษาปรสิตและ ปริมาณแบคทีเรียวิบริโอในกุ้งขาว *P. vannamei* ที่เลี้ยงในบ่อดินในระหว่าง เดือนตุลาคม 2546 ถึง เมษายน 2548 พบชนิดของแบคทีเรียวิบริโอที่พบในตับ ตับอ่อน ลำไส้ และเลือดของกุ้งขาวแวน นานาไม และน้ำในบ่อเลี้ยงจำแนกได้ 6 ชนิด แยกเป็นกลุ่มโคโลนีสีเหลืองได้แก่ *V. alginolyticus* และ *V. cholerae* กลุ่มโคโลนีสีเขียว ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *V. mimicus* ส่วน กลุ่มโคโลนีเรืองแสงจำแนกเป็น *V. harveyi* ปริมาณแบคทีเรียวิบริโอในตับ/ ตับอ่อนของกุ้งที่ศึกษา แบ่งเป็นกลุ่มโคโลนีสีเหลือง เขียว และ เรืองแสง พบว่ามีจำนวนเฉลี่ย 5.83×10^3 ถึง 1.33×10^5 CFU กรัม⁻¹, 5.5×10 ถึง 1.88×10^5 CFU กรัม⁻¹ และ 0 ถึง 1.12×10^3 CFU กรัม⁻¹ ตามลำดับ

ยีนเป้าหมาย (target gene) ที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *V. alginolyticus*

ยีน *gyrB*

เป็นยีนถอดรหัสได้โปรตีน B ซึ่งเป็น subunit ของ DNA gyrase สามารถพบได้ในทุกสาย พันธุ์ของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* การใช้วิธี biochemical test มาทดสอบจำแนกชนิดของเชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ปรากฏว่ามีความคล้ายคลึงกันมากจนบางครั้งไม่สามารถ แยกเชื้อทั้งสองชนิดออกจากกันได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำยีน *gyrB* มาใช้การจำแนกเชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* พบว่าสามารถแยกชนิดของ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ออกจากกันได้ เพราะมีความคล้ายคลึงกัน (similarity) 86.4%

(Venkateswaran; et al 1998: 681-687) และได้มีการนำยีน *gyrB* มาใช้เป็นยีนเป้าหมายในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในอาหารทะเลและน้ำทะเล ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ SYBR Green I (Zhou; et al. 2007: 1897-1906)

ยีน *rpoX*

เป็นยีนถอดรหัสได้ *rpoS*-like sigma factor (RpoX) จัดอยู่ในกลุ่มของ alternative sigma factor ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อความเครียด และเกี่ยวข้องกับการสร้าง biofilm ของแบคทีเรีย (Zhao; et al. 2009: 1-9) ซึ่งความเครียด (stress) ในที่นี้หมายถึง สภาวะการขาดสารอาหาร การมีสารเคมีที่เป็นพิษ นั่นคือ สภาวะทางกายภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้น โดยการปรับตัว เพิ่มความทนทาน (tolerance) ส่งผลให้แบคทีเรียเพิ่มระดับหรือความสามารถในการก่อโรค เนื่องจากแบคทีเรียมีการสังเคราะห์โปรตีน โดยอาศัย sigma (σ) factor ไบโอฟิล์ม (biofilms) คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่รวมกัน มีโครงสร้างจากสารโพลีเมอร์ เช่น แคปซูล (capsule) สารเมือก (slime) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์ ยึดเกาะที่ผิวเพื่อทำหน้าที่เป็นชั้นปกป้องแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใน รวมทั้งสร้างสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่อยู่ภายใน

ยีน *rpoX* มีความสำคัญในการปรับตัวให้อยู่รอดของเชื้อ *V. alginolyticus* ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ hydrogen peroxide สูง และเมื่อถูก treated ด้วย ethanol และ sodium chloride (Zhao; et al. 2009: 1-9) และมีงานวิจัยการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ SYBR Green I และออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน *rpoX* (Zhao; et al. 2011: 137-141)

การตรวจสอบการติดเชื้อ *V. alginolyticus*

การตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในน้ำทะเล และสัตว์ทะเล เช่น ปู หอย ปลา และกุ้ง รวมถึงในตัวอย่างอาหารทะเล สามารถตรวจได้หลายวิธี เช่น ถ้าตรวจการติดเชื้อในกุ้ง อาจดูจากลักษณะภายนอก ดูพยาธิสภาพระดับเนื้อเยื่อหรือเซลล์ และดูจากคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยการทำ biochemical tests (Diggle; et al. 2000: 127-137) เป็นต้น แต่วิธีนี้ต้องใช้เวลาในการตรวจนานค่อนข้างยุ่งยาก และต้องใช้ความชำนาญในการตรวจสูง ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาพัฒนาการตรวจการติดเชื้อ *V. alginolyticus* เช่น เทคนิค PCR, real-time PCR เป็นต้น ซึ่งเทคนิคทางชีวโมเลกุลสามารถทำได้รวดเร็ว ขั้นตอนในการทำไม่ยุ่งยาก ทำให้นิยมนำมาใช้ตรวจพ่อแม่พันธุ์กุ้งก่อนนำไปเพาะเลี้ยง

โมริสตอริส และคนอื่นๆ (Molitoris; et al. 1985: 1388-1394) ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างน้ำทะเลจากอ่าวจาร์กาตา และอาหารทะเลจากตลาดในเมืองจาร์กาตา ประเทศอินโดนีเซีย โดยนำตัวอย่างมาทำการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง thiosulfate citrate bile

sucrose (TCBS) แล้วทำการจำแนกชนิดด้วยวิธี biochemical tests จากการทดลองพบว่า สามารถพบเชื้อ *V. alginolyticus* ประมาณ 80% ของตัวอย่างทั้งหมด

ไดร์-พินโต และคนอื่นๆ (Di-Pinto; et al. 2005: 150-153) ได้ทำการศึกษาการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. cholerae* และ โดยใช้เทคนิค multiplex PCR และใช้ยีน collagenase เป็นยีนเป้าหมาย

ซัวร์ และคนอื่นๆ (Zhou; et al. 2007: 1897-1906) ได้ศึกษาการตรวจการติดเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ในตัวอย่างน้ำทะเล และอาหารทะเล ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้สี SYBR Green I มีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน *gyrB* ของ *V. alginolyticus* พบว่าวิธีนี้ให้ผลบวกเฉพาะเชื้อ *V. alginolyticus* ที่แยกจากตัวอย่างเท่านั้น กล่าวคือไม่เกิด cross reaction กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่แยกได้จากตัวอย่าง ซึ่งความไวในการตรวจหาเชื้อ *V. alginolyticus* คือ 0.4 พิโคกรัมของ genomic DNA และเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) สามารถตรวจพบในระดับ 72 เซลล์ ส่วนในน้ำทะเล หรืออาหารทะเลตรวจพบได้ในระดับ 100 เซลล์

ไคน์ และคนอื่นๆ (Cai; et al. 2010: 480-485) ได้มีการนำเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) มาตรวจหาเชื้อ *V. alginolyticus* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Vibriosis ในปลาทะเล โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *gyrB* จากการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิด ปฏิกิริยา LAMP คือ 64 °C เป็นเวลา 60 นาที สามารถตรวจการติดเชื้อได้ที่ปริมาณ 3.7×10^2 CFU/มิลลิลิตร ($3.7 \text{ CFU reaction}^{-1}$) ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบมากกว่า PCR ถึง 10 เท่า

เนื่องจากยีน *gyrB* ที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ยังมีความคล้ายคลึงกัน 86.4% (Venkateswaran; et al 1998: 681-687) ดังนั้นถ้านำมาใช้เป็นยีนเป้าหมายอาจจะให้ได้ผลที่ผิดพลาด จึงต้องมีการศึกษาหาชนิดอื่น ๆ ที่มีความจำเพาะสูงมาใช้เป็นยีนเป้าหมายแทน โดยยีนชนิดนี้จะต้องสามารถจำแนกเชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* ที่มีความใกล้เคียงกันมากให้ออกจากกันได้

โซร์ และคนอื่นๆ (Zhao; et al. 2011: 137-141) ทำการศึกษาการตรวจการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในปลา ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้สี SYBR Green I และออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR ให้มีความจำเพาะต่อยีน *rpoX* ของ *V. alginolyticus* พบว่าเทคนิคนี้มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสูง สามารถตรวจหาเชื้อ *V. alginolyticus* ได้เมื่อมีปริมาณเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ที่ 10^3 เซลล์ และในตัวอย่างน้ำทะเลที่ 10^2 เซลล์ และไม่เกิด cross reaction กับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* ชนิดอื่นๆ

และเนื่องจากในปัจจุบันเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยต่างๆ ทั้งการตรวจสอบการติดเชื้อทั้งในไวรัส และแบคทีเรีย เพราะว่าสามารถตรวจการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคนี้มาใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิค real-time loop mediated isothermal amplification (real-time LAMP) และเทคนิค loop mediated isothermal amplification ร่วมกับ lateral flow dipstick (LAMP-LFD) เป็นต้น

Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

ในปี คศ. 2000 โนโตมิ และคนอื่นๆ (Notomi; et al. 2000: 28-63) ได้ค้นพบเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง ที่ชื่อว่า loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเทคนิค LAMP มีความแตกต่างจากเทคนิค PCR คือ

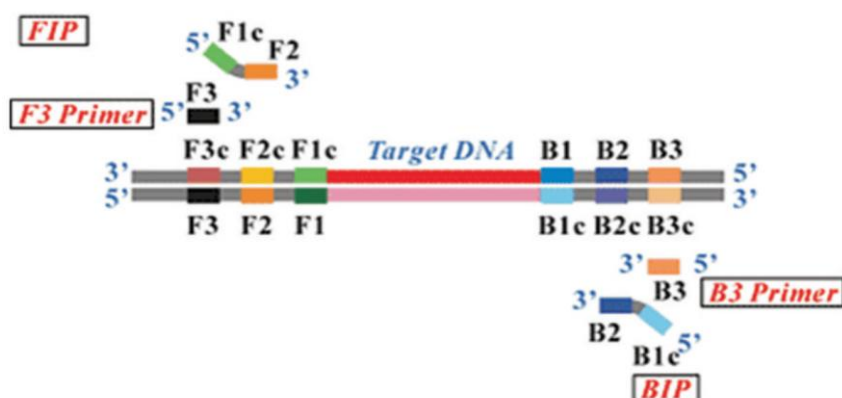
1) มีการใช้ไพรเมอร์อย่างน้อย 4 เส้น (Forward และ Reverse) (ภาพประกอบ 11) โดยออกแบบจากบริเวณที่จำเพาะ 6 บริเวณ ของยีนเป้าหมาย ดังนั้นลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จึงมีความจำเพาะสูง ไพรเมอร์ 4 เส้น ประกอบด้วย inner primers จำนวน 2 เส้น (FIP และ BIP) และ outer primers จำนวน 2 เส้น (F3 และ B3) โดย inner primers ทำหน้าที่สร้าง loop ส่วน outer primers ทำหน้าที่ช่วยให้เกิด strand displacement สมบูรณ์ตลอดสาย ทั้งนี้ outer primers จะถูกใช้เพียงใน initial step เท่านั้น และนอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่ม loop primers เข้าไปยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น (Nagamine; et al. 2002: 223-229)

2) มีการใช้ *Bst* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรและทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 60-65 °C ทำหน้าที่แยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงเหมือนในปฏิกิริยา PCR นอกจากนี้ *Bst* DNA polymerase ยังสามารถเร่งการสังเคราะห์สายพอลิเมอร์ของ DNA (polymerase activity) โดยเติม dNTP เข้าทางด้าน 3'-OH ของสายที่กำลังสร้าง พร้อมกับมี pyrophosphate ions (PPi) ถูกปล่อยออกมา จากนั้น PPi จะจับกับ magnesium ions ที่มีอยู่ในสารละลาย—กลายเป็นตะกอนสีขาวที่ไม่ละลายน้ำที่เรียกว่า magnesium pyrophosphate ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ง่ายด้วยตาเปล่า โดยสังเกตจากความขุ่นที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง (Mori; et al. 2001: 150-154)

3) LAMP ต้องการ DNA สายเดี่ยวที่มีโครงสร้างคล้ายดัมเบล (dumbbell-shaped DNA structures) เป็น DNA template โดยมี loop ที่ปลายทั้งทางด้าน 3' และ 5' ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่าง *Bst* DNA polymerase และ ไพรเมอร์ที่มีลักษณะเฉพาะทำให้มีโครงสร้างเหมือนดัมเบลได้

4) หากนำ LAMP product มาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จะพบเป็นว่า DNA มีหลากหลายขนาดแตกต่างกัน เป็นแถบ ladder

เทคนิค LAMP สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อได้ไม่ว่าจะเป็นไวรัส แบคทีเรีย หรือใช้ในงานวิจัยต่างๆ เช่น การตรวจหาเชื้อไวรัสในกุ่ม Taura syndrome virus (TSV) (Kiatpathomchai; et al. 2007: 214-217), yellow head virus (YHV), white spot syndrome virus (WSSV), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) เป็นต้น หรือแม้กระทั่งการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น การตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในกุ่ม (Prompamorn; et al. 2011: 344-351) เป็นต้น



ภาพประกอบ 11 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค LAMP มีจำนวน 4 เส้นจะถูกออกแบบให้จำเพาะกับ ยีนเป้าหมาย (target DNA) ทั้ง 6 ตำแหน่งคือ ตำแหน่ง F1, F2, F3, B1, B2 และ B3

- 1) Forward inner primer (FIP) ประกอบด้วยบริเวณ F1c และ F2
- 2) Forward outer primer (F3 Primer) ประกอบด้วยบริเวณ F3
- 3) Backward inner primer (BIP) ประกอบด้วยบริเวณ B1c และ B2
- 4) Backward outer primer (B3 Primer) ประกอบด้วยบริเวณ B3

ที่มา : *The principle of LAMP method* (2011). Eiken chemical. Retrieved August, 2011, from <http://www.eiken.co.jp/en>

กลไกการทำงานของ LAMP ประกอบด้วย

1. starting structure producing step (ภาพประกอบ 12)

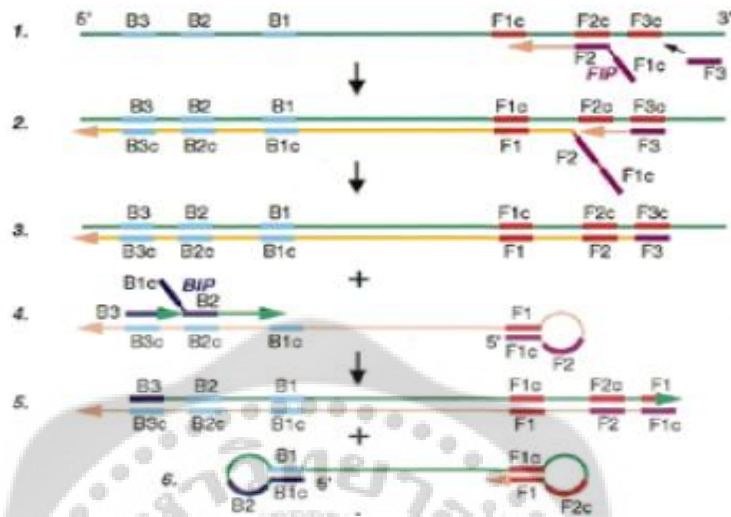
1.1) ที่อุณหภูมิ 65°C DNA สายคู่มีการจับกันแบบสายคู่ (double stranded DNA) และคลายบางส่วนเป็นสายเดี่ยว (single stranded DNA) ตลอดเวลา ทำให้ FIP primer มีโอกาสเข้าไปจับกับ complementary sequence ของยีนเป้าหมายได้ จากนั้น DNA polymerase จะเริ่มทำงาน และแยกสายคู่ของดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว จากนั้นจะมีการสร้าง DNA สายใหม่ขึ้นมา (สายที่ 1)

1.2) ต่อมา F3 Primer (outer primer) จะเข้าไปจับ แล้วเริ่มสร้าง DNA สายใหม่ โดยอาศัยคุณสมบัติของ DNA polymerase with strand displacement จะได้ DNA ที่มี ลักษณะเหมือน template ขณะเดียวกันจะปลดปล่อยสายที่ 1 ออกมาเป็น single strand

1.3) ทางด้าน 5' ของสายที่ 1 จะเป็นส่วนของ F1c (ปลายของ FIP) สามารถเข้าจับกับ F1 สร้าง loop ขึ้นทางด้าน Forward จากนั้น BIP primer จะเข้าจับ และเกิดการสร้าง DNA สายที่ 2 ขึ้นมา

1.4) ในทำนองเดียวกัน B3 Primer ก็จะไปจับ และเริ่มสร้าง DNA สายใหม่ ขณะเดียวกันจะปลดปล่อยสายที่ 2 ออกมาเป็น single strand ขณะที่ปลายด้าน forward จะเป็น

F1 ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ F1c ทำนองเดียวกันด้าน backward จะเป็น B1c ซึ่งจะสร้าง loop โดยจับกับ B1 ทำให้ได้ stem loop ที่มีรูปคล้าย dumbbell shape เพื่อใช้ในขั้นตอน LAMP cycling

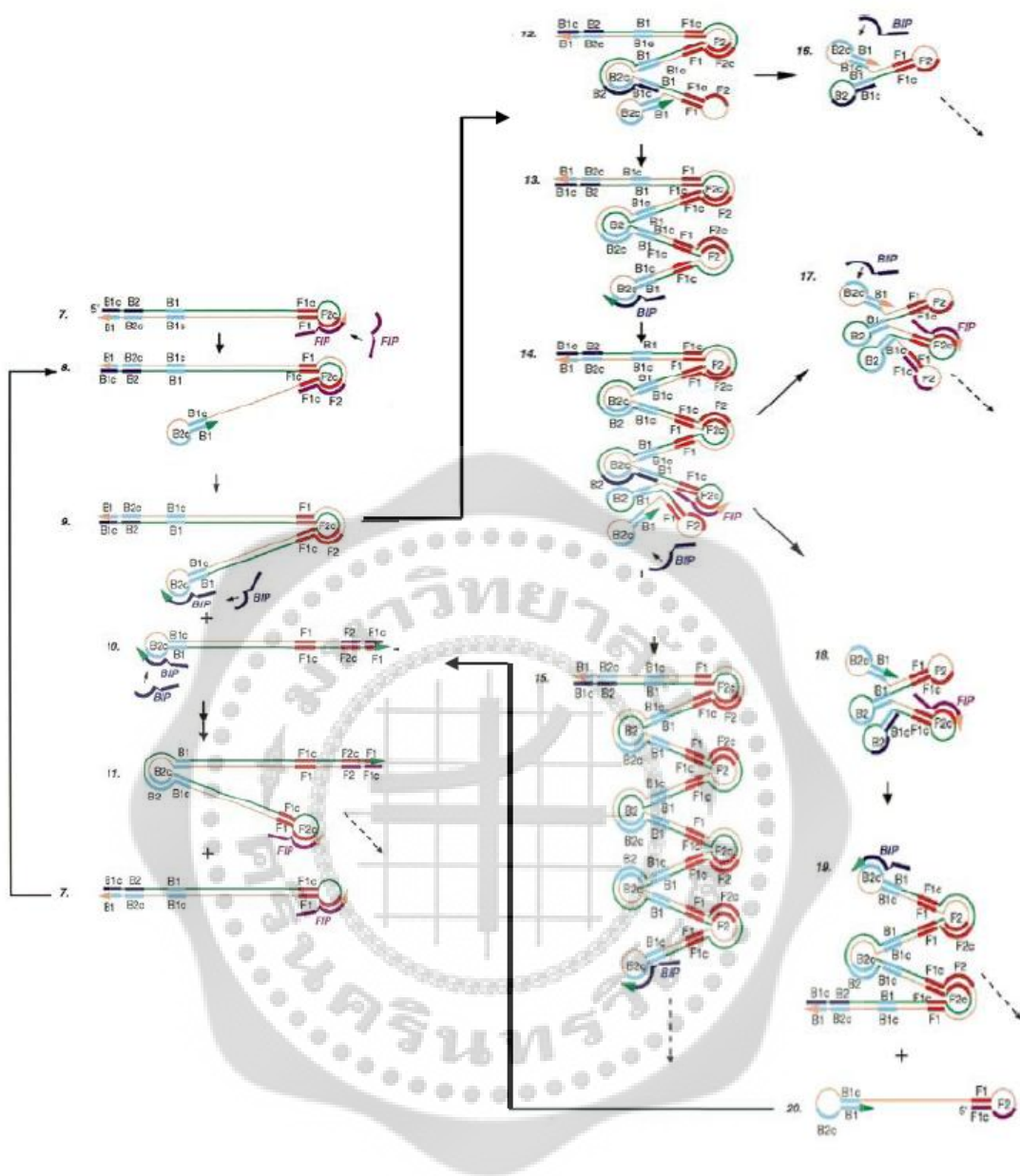


ภาพประกอบ 12 ขั้นตอนการสร้าง Dumbbell-shaped DNA structures ใน initial step เพื่อใช้เป็น DNA template ในเทคนิค LAMP

ที่มา : Notomi; et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: 63.

2. cycle amplification step (ภาพประกอบ 13)

การเกิด cycle amplification step นั้นจะเกิดที่ด้านปลายของ loop forward ก่อน คือ สามารถมี self primed strand displacement DNA synthesis สร้าง DNA จาก F1 ต่อไปเรื่อยๆ จนถึง B1c ขณะเดียวกัน FIP primer ก็สามารรถเข้าจับกับ F2c ที่ loop forward และสร้าง DNA สายใหม่ และมีโครงสร้างเป็น stem loop แบบ dumbbell ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ การทำงานจะเกิดต่อเนื่องกันตลอดเวลา และวนเวียนกันอยู่ จนเกิดโมเลกุลที่เชื่อมต่อกันยาวคล้ายลูกโซ่ มีหลากหลายขนาดที่แตกต่างกัน มีโครงสร้างคล้ายดอกกะหล่ำ (cauliflower-like structure) ทำให้ได้ยีนเป้าหมาย (target DNA) ที่ยาวขึ้นหลายๆ copies ทำให้อัตราการสร้าง DNA ยิ่งมากขึ้น พบว่าสามารถสร้างได้ 10^9 - 10^{10} copies ภายในเวลา 15-60 นาที



ภาพประกอบ 13 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน DNA แบบหมุนเวียนต่อเนื่อง (cycling amplification step) (ขั้นตอนที่ 8 -11)

ที่มา : Notomi; et al (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28: 63.

วิธีการวิเคราะห์ LAMP product

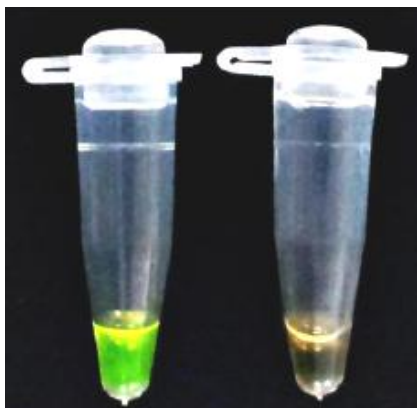
1. การดูความขุ่น ตูผลของปฏิกิริยาจากตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate โดยนำหลอดทดลองไปปั่นให้ตกตะกอน ถ้าเกิดการเพิ่มขยายยีนด้วยปฏิกิริยา LAMP จะพบตะกอนสีขาวมาก (Mori; et al. 2001: 150-154) (ภาพประกอบ 14)



ภาพประกอบ 14 การวิเคราะห์ LAMP product โดยดูจากความขุ่นของหลอดทดลองไม่เกิดปฏิกิริยา LAMP (ซ้าย), เกิดปฏิกิริยา LAMP (ขวา)

ที่มา : Mori, Y.; Hirano, T.; & Notomi, T. (2006). Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnology*. 3-6

2. การดูสีของสารเรืองแสง โดยใช้สารเรืองแสง เช่น SYBR Green I เดิมหลังจากเกิดปฏิกิริยา LAMP แล้ว ถ้ามี LAMP product เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้น (สีส้ม) ให้กลายเป็นสีเขียว เมื่อดูภายใต้แสง UV (Iwamoto; et al. 2003: 2616-2622) (ภาพประกอบ 15) หรืออาจดูภายใต้แสงธรรมชาติ วิธีนี้มีข้อเสีย คือต้องเปิดฝาหลอดทดสอบเพื่อเติมเรืองแสง ทำให้ product มีโอกาสฟุ้งกระจายสูง เกิด carry over ได้ง่าย จึงได้มีผู้ดัดแปลงใช้สาร calcein แทน สารนี้สามารถเติมได้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง สาร calcein จะจับกับ magnesium ดังนั้นเมื่อมี product เกิดขึ้น จะมีสาร pyrophosphate เกิดขึ้นตาม สาร pyrophosphate จะแย่งจับกับ magnesium ทำให้สาร calcein เป็นอิสระจึงให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา (Tomita; et al. 2008: 877-882)



ภาพประกอบ 15 การวิเคราะห์ LAMP product โดยดูจากสีของสารเรืองแสงเกิดปฏิกิริยา LAMP (ซ้าย), ไม่เกิดปฏิกิริยา LAMP (ขวา)

ที่มา : Xu; et al. (2012). Establishment of universal loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for rapid detection of pathogenic *Vibrio* spp. in aquatic organisms. *African Journal of Microbiology Research*. 6(14): 3447-3454.

3. การใช้วิธี agarose gel electrophoresis

สามารถนำ LAMP product ไปแยกโดยวิธี gel electrophoresis ซึ่ง product ที่ได้จะให้ band หลายๆ ขนาด ต่างจากปฏิกิริยาของ PCR product ทั่วไปที่ให้เพียง 1 band ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอน cycle amplification จะได้ขนาดของ DNA แตกต่างกัน

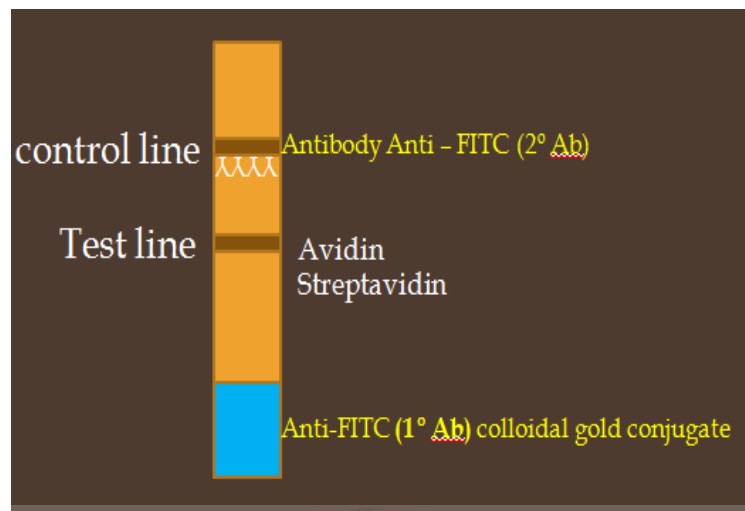
ข้อดีของเทคนิค LAMP

1. มีประสิทธิภาพในการเพิ่มขยายยีนได้สูงภายใต้สภาวะเดียวกันที่อุณหภูมิประมาณ 60 - 65°C มีความไวสูงในการตรวจจับ DNA สามารถตรวจจับ DNA จำนวนน้อยๆ ได้ถึง 6 copies ในการตรวจหาเชื้อไวรัส เทคนิค LAMP มีความไวมากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 10 -100 เท่า
2. LAMP มีความจำเพาะสูงเพราะต้องใช้ specific sites ถึง 6 ตำแหน่ง โดยใช้ไพรเมอร์ถึง 4 เส้น ดังนั้นจะช่วยลด background จากการเพิ่มขยายยีนที่ไม่จำเพาะได้
3. เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทดสอบ ถ้าสามารถสร้าง primer ที่เหมาะสมได้ ใช้เครื่องมือพื้นฐานต่างๆ ไปเช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block
4. การตรวจวัดผลการทดสอบง่าย ไม่ยุ่งยาก และสามารถเลือกวิธีการตรวจวัดได้ ปัจจุบันสามารถวัดแบบ real time ได้
5. สามารถใช้ร่วมกับปฏิกิริยา reverse transcription ก็จะสามารถเพิ่มขยายยีน RNA ได้ในประสิทธิภาพสูง

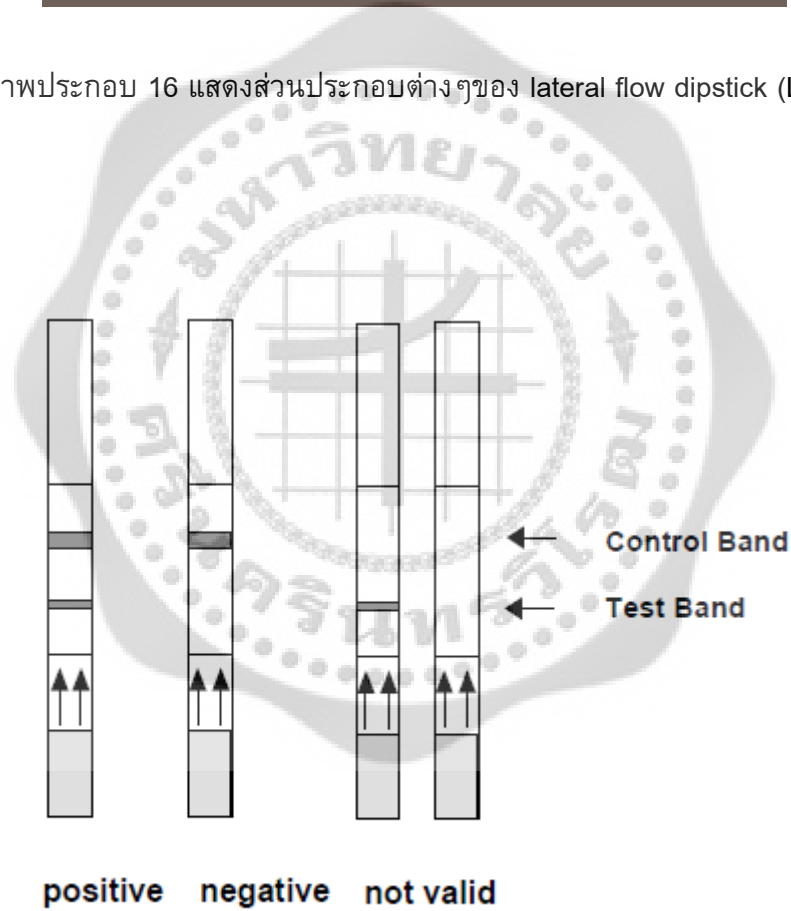
Lateral flow dipstick (LFD)

lateral flow test สามารถวิเคราะห์ LAMP product ที่เกิดขึ้นได้โดยอาศัยหลักการของ nucleic acid hybridization และ chromatography ที่เกิดขึ้นบนแผ่น nitrocellulose membrane ในการทำ LAMP-LFD ต้องมีการออกแบบ probe ที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายที่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (probe-FITC) และ FIP primer ที่มีการติดฉลากด้วย biotin ดังนั้นเมื่อมีการเพิ่มขยายยีนโดยปฏิกิริยา LAMP จะมีการเติม probe ลงไป เพื่อให้เกิดการ hybridize กันระหว่าง probe-Fluorescein isothiocyanate (FITC) กับ LAMP product ที่มี biotin ติดอยู่ แต่ถ้าไม่เกิดการเพิ่มขยายยีนเป้าหมาย probe-FITC ก็จะไม่สามารถไป hybridize ได้ จากนั้นนำ hybridization product ไปวิเคราะห์ด้วย lateral flow dipstick (LFD) (ภาพประกอบ 16) ซึ่งประกอบด้วย บริเวณแรก มีแอนติบอดีตัวแรก (1° Ab) ที่มีความจำเพาะต่อ FITC ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคของ colloidal gold ถัดมาเป็นบริเวณที่เรียกว่า T-line ซึ่งมีสาร Avidin streptavidin ที่มีความจำเพาะต่อ biotin ติดอยู่ ถัดมาเป็นบริเวณที่เรียกว่า C-line ซึ่งมี 2° Ab ที่มีความจำเพาะต่อ 1° Ab ติดอยู่ กล่าวคือ ถ้ามี LAMP product เกิดขึ้น เมื่อนำมาทำ LFD พบว่าเกิดแถบสีขึ้น 2 แถบที่บริเวณ T-line และ C-line แต่ถ้าไม่มี LAMP product เกิดขึ้น เมื่อนำมาทำ LFD พบว่าจะเกิดแถบสีขึ้นเพียงแถบเดียวที่ C-line (ภาพประกอบ 17)

ดังนั้นเทคนิค lateral flow dipstick จึงถูกนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค LAMP ในการนำมาใช้ในการตรวจสอบและงานวิจัยอย่างแพร่หลาย เช่น การตรวจสอบเชื้อไวรัส Taura syndrome virus (TSV) ในกุ้ง (Kiatpathomchai; et al. 2007: 214-217) การตรวจสอบเชื้อ Infectious myonecrosis virus (IMNV) ในกุ้ง (Puthawibool; et al. 2009: 27-31) การตรวจการติดเชื้อ *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus (PemoNPV) ในกุ้งกุลาดำ (Chaivisuthangkura; et al. 2009) การตรวจหาการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้ง (Prompamorn; et al. 2011: 344-351), การตรวจหาการติดเชื้อ *V. vulnificus* ในหอยนางรมโดยใช้ยีน *rpoS* เป็นยีนเป้าหมาย (Surasilp; et al. 2011: 158-163) เป็นต้น



ภาพประกอบ 16 แสดงส่วนประกอบต่างๆของ lateral flow dipstick (LFD)



ภาพประกอบ 17 แสดงผลจากการวิเคราะห์ LAMP product ด้วย Lateral flow dipstick (LFD)

ที่มา : บริษัท Milenia® HybriDetect (Germany)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

1. กุ้งขาว *Penaeus vannamei* ที่ติดเชื้อ IMNV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.แสงจันทร์ เสนาปิ่น, Centex of Excellence in Shrimp Biotechnology, มหาวิทยาลัยมหิดล
2. กุ้งขาว *Penaeus vannamei* ที่ปลอดเชื้อ *Vibrio alginolyticus*

อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ

1. เครื่องปั่นตกตะกอนตัวอย่างความเร็วสูง
2. เครื่อง thermal cycler (Eppendorf)
3. เครื่อง electrophoresis apparatus (Bio-Rad) และอุปกรณ์

สารเคมี

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI (New England Biolab)
2. ชุด Nucleospin plasmid kit (QIAGEN)
3. ชุด MinElute Reaction clean up kit (QIAGEN)
4. T7 Transcription kit (Fermentas)
5. พลาสมิด pBluescript KS (New England Biolab)
6. QIAamp DNA mini kit (QIAGEN)
7. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว tryptic soy broth (TSB) (Difco,USA)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) (Difco,USA)
9. High Pure Viral Nucleic acid kit (Roche,Germany)
10. SuperScript III one step RT-PCR (Invitrogen)
11. ยาปฏิชีวนะ Ampicillin และ Kanamycin (Sigma)
12. ชุด Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen)
13. ชุด LFD strip test (Milenia® GenLine HybriDetect 2T)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV

1.1 สกัด RNA ของไวรัสในกึ่งตัวอย่าง

นำเนื้อเยื่อบริเวณส่วนท้องของกึ่งขาวที่มีการติดเชื้อ IMNV ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ไนโตรเจนเหลวในโกร่งสำหรับบดตัวอย่าง เติม lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA (pH8.0), 3% sodium dodecyl sulfate, 1% β -mercapto ethanol) เพื่อให้เซลล์แตก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ $3500 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสมา 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดกรดนิวคลีอิกของไวรัสด้วยชุด High Pure Viral Nucleic acid kit (Roche, Germany)

1.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ RT-LAMP-IMNV

ออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณลำดับเบสของยีนที่ถอดรหัสเป็นส่วนของ capsid protein (GenBank accession no. AY570982, Poulos & Lightner. 2006: 69-72) โดยใช้โปรแกรม Primer Explorer version 4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) (ภาพประกอบ 18 และตาราง 1)

```

1261 TTGATGGCAG CACGTCAAAA TGCTATGTA TTGAGTACTC TATTTCCTCC ACTAATTCAG
                                F3          F2
AACTACCGTC GTGCAGTTTT ACGATACAAT AACTCATGAG ATAAAGGAGG TGATTAAGTC
1321 AGCAATGTGGCTTCAGACAC AAAGGAAGTC GGTCCCTTGT CACCTCGTAT GACTGCATGT
                                F1c
TCGTTACACC GAAGTCTGTG TTTCTTCAG CCAGGAACAG CTGGAGCATA CTGACGTACA
                                B1c
1381 CTTGCAAAC TTAGTATTCC TGAAACACTA ACAGTAACT GGGGAGAAGA TATAAATGTT
GAACGTTTGA ATCCATAAGG ACTTTGTGAT TGTC AATTGA CCCCTCTTCT ATATTTACAA
1441 GTCGGTAACA TAGTCGATGA ACTTTGCCTG TAGTGTGCGCC ACAATCGGTA CGTATTAAG
                                B2          B3
CAGCCATTGT ATCAGCTACT TGAAACGGAC ATCAGAG CGG TGTTCCGCAT GCATAATTC
1501 CTGTTTAAAA GAGAAGAAGT GATAGCAGGT GCATATGAAT TTGGGTGTT GGGACACATG
GACAAATTTT CTCTTCTTCA CTATCGTCCA CGTATACTTA AACCCACCAA CCCTGTGTAC

```

ภาพประกอบ 18 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ capsid protein gene ของ IMNV (GenBank accession no. AY570982) ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT- LAMP

ตาราง 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RT- LAMP – IMNV

Primer	Gene position	Sequence (5'-3')
F3	1286-1308	TGTTATTGAGTACTCTATTTCC
B3	1479-1499	TTTAATACGTACCGATTGTGG
Forward inner primer	1310-1330/TTTT/1351-1371	GTATGCTCCAGCTGTTCTGGTTTTCACCTAATTCAGAGCAATGTGG
Backward inner primer	1399-1423/TTTT/1455-1473	CCTGAAACACTAACAGTTAACTGGGTTTTGATGTCGGTTTCAAGTAGC

1.3 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ RT-LAMP-IMNV

ทำการทดลอง RT-LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ capsid protein gene ของ IMNV (ตาราง 1) และทำปฏิกิริยา RT- LAMP ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ 60°C หรือ 63°C หรือ 65 °C เป็นเวลา 60 นาที สำหรับส่วนผสมต่างๆ ของ RT-LAMP reaction แสดงดังตาราง 2

ตาราง 2 ส่วนผสมของการทำ RT- LAMP – IMNV

ส่วนผสมของ RT- LAMP reaction	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
RNA ของ IMNV	5
Forward inner primers (FIP) (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Backward inner primers (BIP) (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Forward outer primers (F3) (40 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Backward outer primers (B3) (40 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
25 mM dNTPs	1.4
5 M Betaine	4
50 mM MgSO ₄	3
10X <i>Bst</i> buffer	2.5
8 U of <i>Bst</i> DNA polymerase	1
2.5 U of AMV Reverse transcriptase	1
Sterile water	3.1
ปริมาตรสุทธิ	25

เวลาและอุณหภูมิของ RT- LAMP reaction เริ่มจากการใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้อุณหภูมิ 60°C หรือ 63°C หรือ 65°C เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที นำ RT-LAMP product มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel

electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 60 นาทีแล้วส่องดูภายใต้แสง UV

1.4 การเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ระหว่างเทคนิค RT-LAMP กับเทคนิค RT-PCR

นำ RNA ของไวรัสที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV มาทำ ten fold serial dilution ให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า (10^{-1} ถึง 10^{-9}) มาใช้เป็น template จากนั้นนำมาทำ RT-LAMP (ตามวิธีการข้อ 1.3) และทำ RT-PCR โดยใช้ F3 และ B3 primers (ตาราง 1) และใช้ชุด kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) โดยมีส่วนผสมต่างๆ ของ RT-PCR reaction แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 ส่วนผสมของการทำ RT-PCR – IMNV

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA ของ IMNV (10^{-1} - 10^{-9})	5
Forward primers (F3) (20 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Backward primers (B3) (20 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
2X Reaction Mix	25
SuperScript III with Platinum® Taq DNA Polymerase	1
Sterile water	17
ปริมาตรสุทธิ	50

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ทำ cDNA synthesis คือ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที

เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ทำ PCR amplification คือ

ขั้นตอนที่ 1 **initial denaturation** อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 **denaturation** อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 **annealing** อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 4 **extension** อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 15 วินาที

ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (2)-(4) เป็นจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 6 **final extension** อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด

นำ RT-LAMP product และ RT-PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gels ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 60 นาที แล้วส่องดูภายใต้แสง UV

1.5 การหาความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ IMNV โดยใช้เทคนิค RT-LAMP

นำ RNA หรือ DNA ของไวรัสชนิดอื่นๆ ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสอื่น เช่น White spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), monodon baculovirus (MBV), *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) และ yellow head virus (YHV) มาใช้ในการทำ RT-LAMP reaction (ตามข้อ 1.3)

1.6 การศึกษาความไวของเทคนิค RT-LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ IMNV

ทำการสังเคราะห์ RNA ในหลอดทดลอง (*in vitro* transcription) นำพลาสมิด pGEX-IMNV-int ที่มี capsid protein gene ของ IMNV (อารีรัตน์ และคนอื่นๆ. 2552) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI จากนั้นนำ fragment ที่ได้มาโคลนเข้ากับพลาสมิด pBluescript KS แล้วนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue คัดเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB broth) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องบ่มแบบเขย่า (shaker incubator) ความเร็วรอบ 225 rpm ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสกัด Nucleospin plasmid kit นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III เพื่อให้พลาสมิดเป็นเส้นตรง แล้ว clean up ด้วยชุด MinElute Reaction cleanup kit จากนั้นทำการสังเคราะห์ RNA ในหลอดทดลองด้วยชุด T7 Transcription kit (Fermentas) กำหนดหาความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง Fluorometer โดยใช้ชุด Quant-iT™ RNA Assay Kits (Molecular Probes) ในการสร้างกราฟ RNA มาตรฐาน ทำ ten fold serial dilution ของ RNA ที่สังเคราะห์ได้ ให้มีความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า (10^{-1} ถึง 10^{-9}) นำ RNA ในแต่ละ dilution มาทำ RT-LAMP (ตามวิธีการข้อ 1.3) เพื่อวิเคราะห์หาจำนวน copy number ของ IMNV ที่น้อยที่สุดที่วิธี RT-LAMP สามารถตรวจสอบได้

2. การตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus*

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *V. alginolyticus* และแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ชนิดอื่นๆ มาวิเคราะห์ชนิดโดยการทำการยีนย่นสปีชีส์ด้วยวิธีการวิเคราะห์ยีน 16S rDNA (Weisberg; et al., 1991: 679-703) ซึ่งตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบคือ *V. alginolyticus* Y16, Y17, S24, SWU2, SWU3, SWU4, SWU5, SWU6

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA มาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียได้ถึงในระดับสปีชีส์ มีหลักการวิเคราะห์โดยทำการเพิ่มขยาย DNA บางส่วนของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์

fD1 primer 5' CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' และ

rP2 primer 5' CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCCCTTGTACGACTT 3'

สำหรับปฏิกิริยา **PCR amplification** คือ

ขั้นตอนที่ 1 **initial denaturation** อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 **denaturation** อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 **annealing** อุณหภูมิ 43 °C เป็นเวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 4 **extension** อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (2) ถึง (4) เป็นจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 6 **final extension** อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด

นำผลผลิต PCR ที่ได้ มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1.5% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 60 นาที แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV PCR product ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 1,500 bp จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN) นำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy Vectors (Promega) แล้วนำพลาสมิดลูกผสม transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ X1-blue คัดเลือกโคลนที่มีชั้นดีเอ็นเอโดยนำโคลนที่มีสีขาวมาเลี้ยงใน LB broth โดยเลี้ยงไว้ข้ามคืนใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 °C 225 รอบต่อนาที จากนั้นนำ culture ที่เลี้ยงไว้มาทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุด QIAprep Spin Miniprep kit แล้วตัดด้วย *EcoRI* restriction enzyme เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะแยกเฉพาะส่วนของยีนออกมา นำโคลนที่มีขนาดยีนสอดคล้องกับที่ถูกต้องไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นเปรียบเทียบว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล GenBank จาก National Center for Biotechnology Information server (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2.2 การสกัด DNA ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ทุกชนิด มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS agar, Difco) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นสกัด DNA ของแบคทีเรียด้วยชุด QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) เก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่ -20 °C จนกระทั่งนำมาใช้

2.3 การวิเคราะห์เชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยวิธี polymerase chain reaction

(PCR)

นำ DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียตัวอย่างมาใช้เป็น template ในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *rpoX* โดยใช้ไพรเมอร์ (ตาราง 4) และสภาวะในการทำปฏิกิริยาตามวิธีการของ โชร์ และคนอื่นๆ (Zhao; et al. 2011: 137-141) และทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *gyrB* โดยใช้ไพรเมอร์ (ตาราง 4) และสภาวะในการทำปฏิกิริยาตามวิธีการของซัวร์ และคนอื่นๆ (Zhou; et al. 2007: 1897-1906) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gels ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 60 นาที แล้วส่องดูภายใต้แสง UV

ตาราง 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR

Target gene	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>rpoX</i>	<i>rpoX</i> -F (ACGCTGCTCAGGGGTGAAAGC)	354
	<i>rpoX</i> -R (CGGAGACGTTTCTGCACGCGT)	
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F (ATTGAGAACCCGACAGAAGCGAAG)	340
	<i>gyrB</i> -R (CCTAATGCGGTGATCAGTGTTACT)	

2.4 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ LAMP- LFD ของ *V. alginolyticus*

ทำการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoX* ของ *V. alginolyticus* (GenBank accession no.FJ358498.1) โดยใช้โปรแกรม Primer Explorer version 4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) (ภาพประกอบ 19) (ตาราง 5) สำหรับการวิเคราะห์ LAMP product ด้วยเทคนิค lateral flow dipstick (LFD) จะต้องทำการติดฉลาก Forward inner primer (FIP) ที่ปลาย 5' ด้วย biotin และออกแบบ probe ที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) เพื่อทำปฏิกิริยาในขั้นตอนของ LFD

F3 F2
 61 TGATGTATCG ACCACTGCGG ACCTACATCG CGTTCATT GTTCTTGAAC TGTGTGAAAG
 ACTACATAGC TGGTGACGCA TGGATGTAGC GCAAGGTAAA CAAGAACTTG ACACACTTTT

 121 TGAGTATACG CCAGATCCAC AACAAAGACTG TGAAAACCAG TGCTTTACTC AAGCTATTGA
 ACTCATATGC GGTCTAGGTG TTGTCTGAC AGTTTTGGTC ACGAAATGAG TTCGATAACT

 F1c
 B1c FITC probe
 181 AAATATTATT AAAACCTTGC CAACTAAGTT GCAGAAAGTC TTGATCCATC GATTCGGATT
 TTTATAATAA TTTTGGAACG GTTGATTCAA CGTCTTTCAG AACTAGGTAG CTAAGCCTAA
 B2
 241 ATTTGACCAG AGAGTGAAAA CTTGTCCGA AATAGGCCTG TTATTAAACG TATCTAACGA
 TAAACTGGTC TCTCACTTTT GAAACAGCCT TTATCCGGAC AATAATTTGC ATAGATTGCT
 B3

ภาพประกอบ 19 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoX* ของ *V. alginolyticus* ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (GenBank accession no.FJ358498.1)

ตาราง 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ LAMP-LFD

Primer	Gene position	Sequence (5'-3')
F3	62-79	GATGTATCGACCACTGCG
B3	255-275	CTATTTCCGACAAAGTTTTTAC
Forward inner primer	96-116/TTTT/137-160	CTGGTTTTTACAGTCTTGTGTGGTTTTTCATTTGTTCTTGAAGTGTGTG
Backward inner primer	193-213/TTTT/230-253	AACCTTGCCAACTAAGTTGCATTTTTCTCTGGTCAAATAATCCGAATC
FITC probe	220-239	CTTGATCCATCGATTCCGGAT

2.5 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ LAMP-*V. alginolyticus*

ทำการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 60 °C หรือ 63°C หรือ 65°C และใช้เวลาที่ต่าง ๆ กัน ได้แก่ 30 หรือ 45 หรือ 60 นาที สำหรับส่วนผสมต่างๆ ของ LAMP reaction แสดงดังตารางที่ 6

ตาราง 6 ส่วนผสมของการทำ LAMP- *V. alginolyticus*

ส่วนผสมของ LAMP reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA ของ <i>V. alginolyticus</i>	5
Forward inner primers (FIP) (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Backward inner primers (BIP) (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Forward outer primers (F3) (40 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Backward outer primers (B3) (40 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
25 mM dNTPs	1.4
5 M Betaine	4
50 mM MgSO ₄	3
10X <i>Bst</i> buffer	2.5
8 U of <i>Bst</i> DNA polymerase	1
Sterile water	4.1
ปริมาตรสุทธิ	25

เวลาและอุณหภูมิของ LAMP reaction เริ่มจากการใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้อุณหภูมิ 60°C หรือ 63°C หรือ 65°C เป็นเวลา 30 หรือ 45 หรือ 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที นำ LAMP product มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ 1.5% agarose gels ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 60 นาทีแล้วส่องดูภายใต้แสง UV

2.6 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ในการวิเคราะห์ LAMP product ด้วยวิธี Lateral flow dipstick

นำ DNA probe ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rhoX* โดย DNA probe นี้ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง FITC ที่ปลาย 5' (ตาราง 5) ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ probe จะมีการทดลองโดยเลือกจากความเข้มข้นของ DNA probe ที่แตกต่างกันคือ 200, 20 และ 2 พิโคโมล

ทำปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ส่วนผสมต่างๆ และใช้สภาวะอุณหภูมิต่างๆ (ตามวิธีการข้อ 2.5) แต่มีการใช้ Forward inner primer (FIP) ที่มีการติดฉลากด้วย biotin ที่ปลาย 5' (ตาราง 5) มาใช้แทน FIP ที่ไม่มีการติดฉลากด้วย biotin จากนั้นนำ LAMP product มา hybridize กับ probe โดยแบ่ง LAMP product มา 8 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 3 หลอด ที่มีความเข้มข้นของ probe ที่แตกต่างกันคือ 200, 20 และ 2 พิโคโมล บ่มที่อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำ product

ในแต่ละหลอดมาหลอดละ 8 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 150 ไมโครลิตร ของ assay buffer (Milenia[®] Genline HybriDtect) ผสมให้เข้ากันแล้วนำแผ่น dipstick ลงไปจุ่มทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที แล้วสังเกตผล

2.7 การตรวจสอบความไวของการวิเคราะห์เชื้อ *V. alginolyticus* ในสภาพเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค LAMP-LFD และเทคนิค PCR

ในการทดลองนี้ทำตามวิธีการของยามาซากิ และคนอื่นๆ (Yamazaki; et al. 2008: 163) โดยนำตัวอย่างของ *V. alginolyticus* S24 มาใช้ในการตรวจสอบความไวของ LAMP reaction โดยทดสอบกับเชื้อที่เลี้ยงแบบบริสุทธิ์ (pure culture) และเชื้อที่เติมในตัวอย่างกึ่ง (spiking) นำเชื้อ *V. alginolyticus* S24 มาแยกเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยนำมาขีดลาก (streak plate) ลงบนอาหารแข็ง TSA ที่เติม 2% NaCl เลือกโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงใน TSB ที่มีปริมาตร 4 มิลลิตร บ่มเชื้อแบบเขย่า (shaker incubator) ที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมา 40 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ที่มี TSB อยู่ 4 มิลลิตร นำไปบ่มเชื้อแบบเขย่าที่ 37 °C ประมาณ 1-2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.4-0.5 จากนั้นนำเชื้อมาทำ ten fold serial dilution ใน phosphate buffer saline (PBS) ให้มีความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-9} จากนั้นนำ 100 ไมโครลิตร ของแต่ละความเจือจางมาทำ plate count และอีก 100 ไมโครลิตร มาสกัด DNA โดยมีวิธีการคือ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $20000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนบน (supernatant) ทิ้งไป เติม 25 mM NaOH ลงไป 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไป heat ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1M Tris - HCl buffer (pH7.5) ลงไป 4 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $20000 \times g$ ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บส่วนบนไว้ แล้วนำ DNA ที่สกัดได้มาทำ PCR และ LAMP-LFD ตามวิธีการในข้อ 2.3 และ 2.5 ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นที่ 1.8×10^8 CFU ml⁻¹ มาเป็น DNA template

2.8 การตรวจสอบหาความไวในการวิเคราะห์เชื้อ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างของกึ่งที่เติมเชื้อ (spiking) โดยใช้ LAMP-LFD และเทคนิค PCR

ในการทดลองนี้ทำตามวิธีการของยามาซากิ และคนอื่นๆ (Yamazaki; et al. 2008: 163) เตรียมเชื้อ *V. alginolyticus* S24 ให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ตามวิธีการในข้อ 2.7 แล้วนำมาทำ ten fold serial dilution ใน phosphate buffer saline (PBS) ซึ่งมีความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-9} นำ 100 ไมโครลิตร ในแต่ละความเจือจางมาทำ plate count

เตรียมเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบโดยวิธี PCR แล้วพบว่าปลอดเชื้อ *V. alginolyticus* โดยนำเนื้อเยื่อมา 1 กรัม ไปบด แล้วบ่มรวมกับ 9 มิลลิตร ของ alkaline peptone water (APW) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแบ่งใส่หลอด

ทดลอง หลอดละ 900 ไมโครลิตร จำนวน 9 หลอด เพื่อนำไปผสมกับแบคทีเรียบริสุทธ์ซึ่งมีความ
เจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-9} ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำแต่ละความเจือจางมา 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้า
กัน (แบคทีเรียบริสุทธ์ : เนื้อเยื่อที่บ่มใน APW คือ 1:10) จากนั้นนำส่วนผสมมาสกัด DNA แล้ว
นำมาทำ PCR และ LAMP ทำตามวิธีการในข้อ 2.3 และ 2.5 ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อ
เริ่มต้นที่ 2×10^8 CFU g^{-1} มาเป็น DNA template



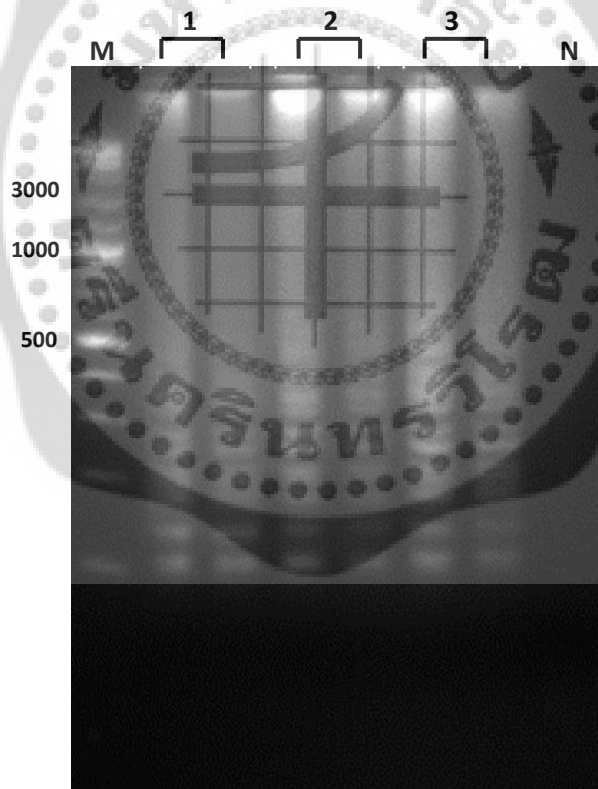
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบเชื้อ *infectious myonecrosis virus* (IMNV)

1.1 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ RT-LAMP-IMNV

จากผลการทดลองทำ RT-LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ capsid protein gene ของ IMNV (ตาราง 1) โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ 60°C หรือ 63°C หรือ 65°C เป็นเวลา 60 นาที พบว่า อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับ RT-LAMP reaction คือ 65°C เป็นเวลา 60 นาที เนื่องจากให้ผลการเกิด ladder pattern ชัดเจนที่สุด (ภาพประกอบ 20) เมื่อนำ RT-LAMP product มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis



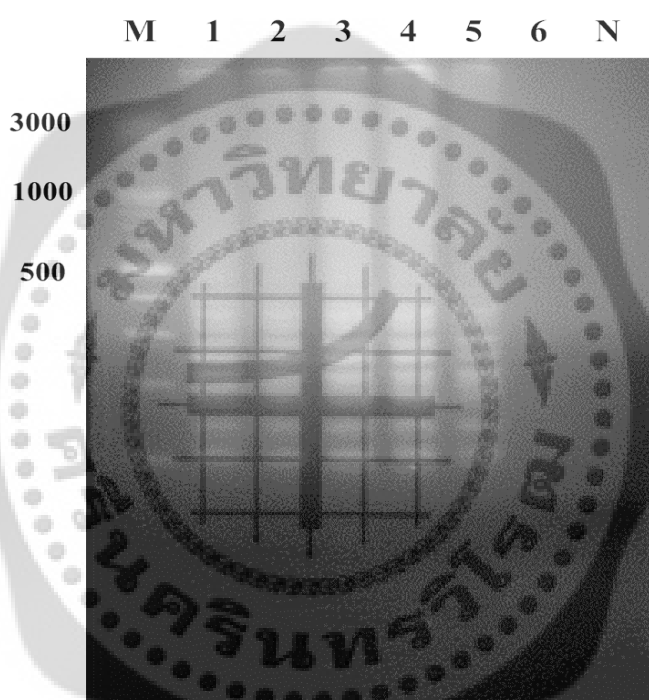
ภาพประกอบ 20 แสดงผลการทำ RT-LAMP reaction ที่อุณหภูมิต่างๆ Lane M: Molecular marker; Lane 1: 60°C; lane 2: 63°C; lane 3: 65°C; lane N: no template (negative control)

1.2 การศึกษาเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ระหว่าง

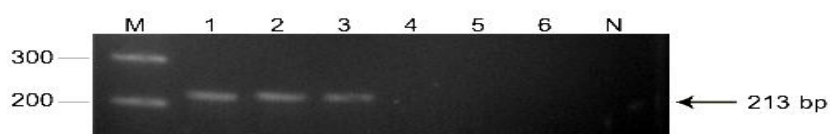
เทคนิค RT-LAMP กับเทคนิค RT-PCR

จากการทำ RT-LAMP และ RT-PCR โดยใช้ RNA ของไวรัสที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อ
กึ่งที่ติดเชื้อ IMNV เป็น template พบว่าเทคนิค RT-LAMP สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ได้
ที่ 10^{-5} (ภาพประกอบ 21 ก) ในขณะที่เทคนิค RT-PCR สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ได้ที่
 10^{-3} (ภาพประกอบ 21 ข) เมื่อนำ RT-LAMP product มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel
electrophoresis

ก



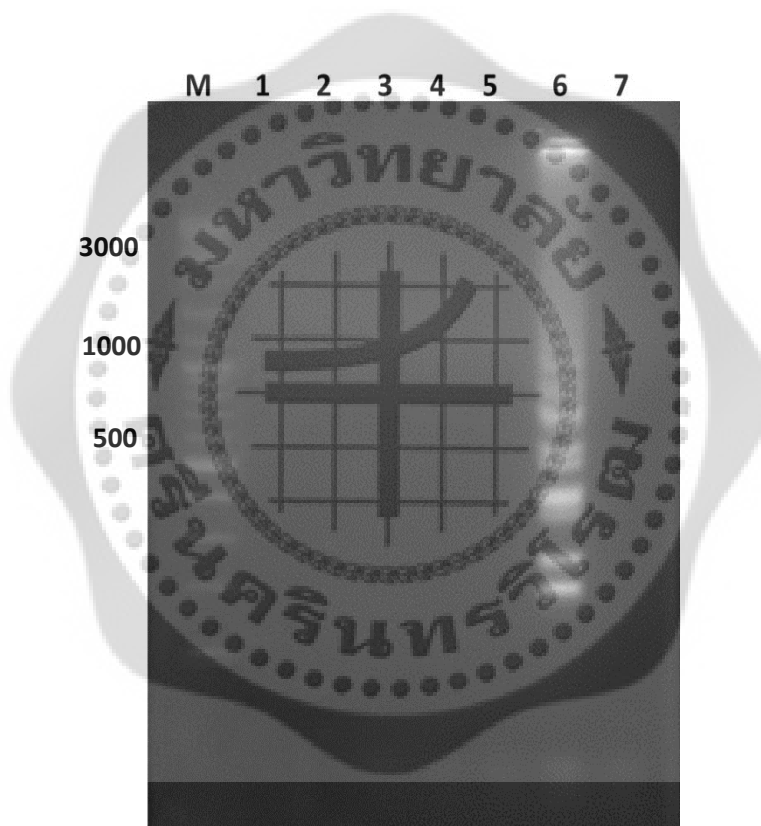
ข



ภาพประกอบ 21 แสดงการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ระหว่างเทคนิค RT-
LAMP (ก) กับเทคนิค RT-PCR (ข); Lane M: molecular marker; lanes 1-6: RNA ของไวรัส
ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกึ่งที่ติดเชื้อ IMNV มาทำ ten fold serial dilution ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1}
ถึง 10^{-6} ตามลำดับ; lane N: no template (negative control)

1.3 การหาความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ IMNV โดยใช้เทคนิค RT-LAMP

เมื่อนำกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น White spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), monodon baculovirus (MBV), *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) และ yellow head virus (YHV) ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสมาใช้เป็น template ในการทำ RT-LAMP พบว่าไม่เกิด LAMP product (ภาพประกอบ 22) แสดงว่าเทคนิค RT-LAMP ที่ใช้ในตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV มีความจำเพาะเนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในกุ้ง

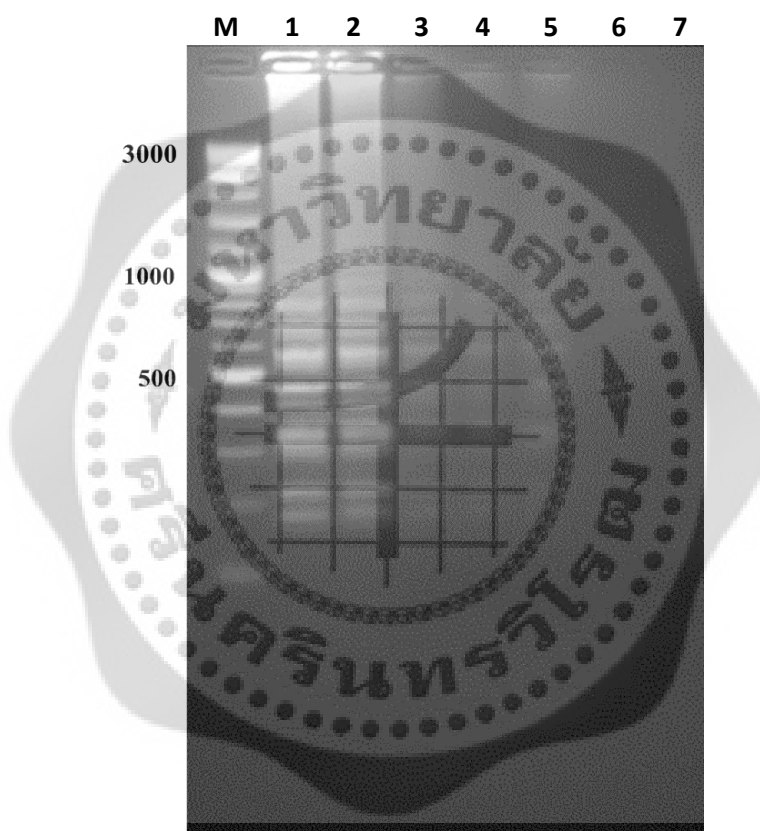


ภาพประกอบ 22 แสดงการทำ RT-LAMP โดยใช้กรดนิวคลีอิกที่สกัดได้จากกุ้งที่ติดเชื้อไวรัส

Lane M: molecular marker; lane 1: White spot syndrome virus (WSSV); lane 2: Monodon baculovirus (MBV); lane 3: Yellow head virus (YHV); lane 4: Taura syndrome virus (TSV); lane 5: *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*); lane 6: Infectious myonecrosis virus (IMNV) (positive control); lane 7: no template (negative control)

1.4 การหาความไวของเทคนิค RT-LAMP ในการตรวจสอบเชื้อ IMNV

เมื่อนำ RNA ที่สังเคราะห์ได้ในหลอดทดลอง (*in vitro* transcription) มาทำ ten fold serial dilution (เริ่มจาก 3.8×10^7 ถึง 3.8×10^2 copies) และใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับ RT-LAMP reaction ที่ 65°C เป็นเวลา 60 นาที พบว่าเทคนิค RT-LAMP สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ได้ที่ 3.8×10^3 copies (ภาพประกอบ 23 lane 5) เมื่อนำ RT-LAMP product มาวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis



ภาพประกอบ 23 แสดงการทำ RT-LAMP โดยใช้ RNA ที่สังเคราะห์ได้ในหลอดทดลอง (*in vitro* transcription) Lane M: molecular marker; lanes 1-6: ความเข้มข้นของ RNA ตั้งแต่ 3.8×10^7 ถึง 3.8×10^2 copies ตามลำดับ; lane N: no template (negative control)

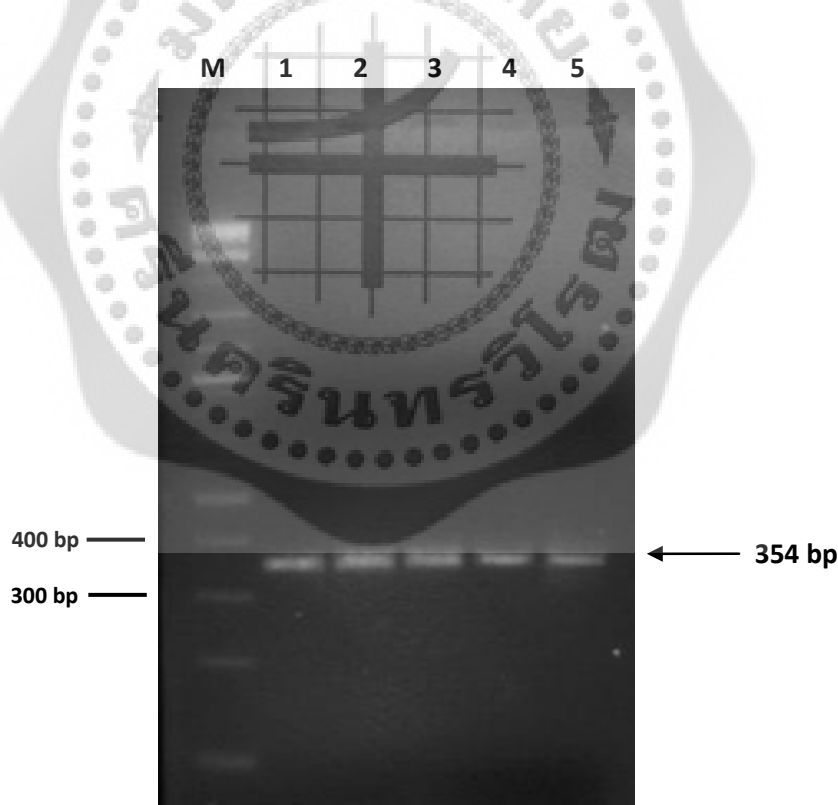
2. การตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus*

2.1 การวิเคราะห์แบคทีเรีย *V. alginolyticus* ด้วยการวิเคราะห์ 16S rDNA

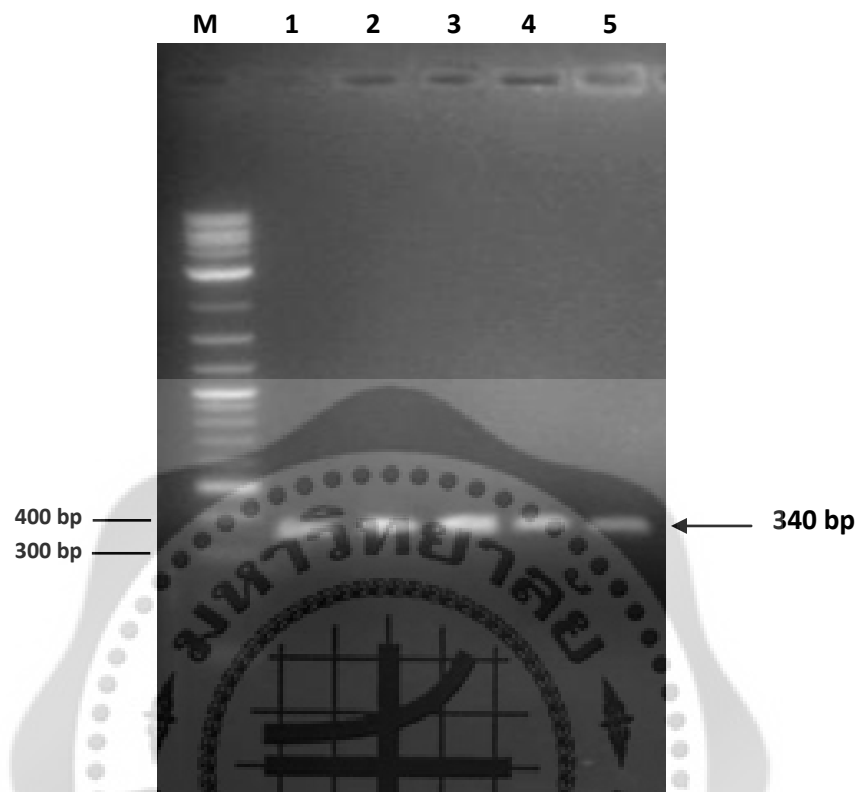
จากการนำแบคทีเรียตัวอย่างคือ *V. alginolyticus* Y16, Y17, S24, SWU2, SWU3, SWU4, SWU5, SWU6 มาวิเคราะห์ด้วยวิธี 16S rDNA ตามวิธีการของ Weisberg; et al., 1991 พบว่าแบคทีเรียตัวอย่างดังกล่าวที่นำมาทดสอบเป็นแบคทีเรีย *V. alginolyticus*

2.2 การวิเคราะห์เชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยวิธี PCR

จากการนำ DNA ของแบคทีเรียที่สกัดได้จากตัวอย่าง (ตาราง 4) มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ยีน *rpoX* และยีน *gyrB* เป็นยีนเป้าหมายพบว่าแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ในทุกตัวอย่าง ให้ผลเป็นบวก คือมี PCR product ซึ่งมีขนาด 354 bp (ภาพประกอบ 24; แสดงผลเป็นตัวอย่างเพียง 5 isolate) และ 340 bp (ภาพประกอบ 25; แสดงผลเป็นตัวอย่างเพียง 5 isolate) เกิดขึ้น และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่แบคทีเรีย *V. alginolyticus* ให้ผลเป็นลบ โดยไม่มี PCR product เกิดขึ้น



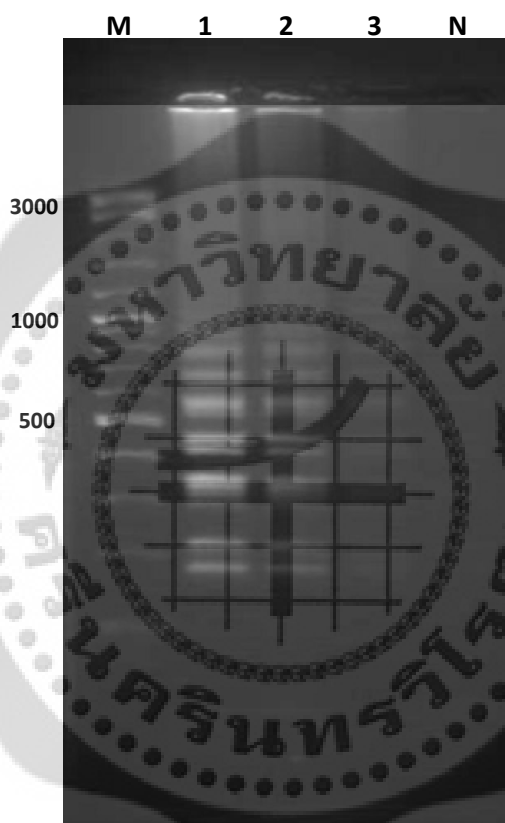
ภาพประกอบ 24 แสดงการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ยีน *rpoX* เป็นยีนเป้าหมาย; Lane M: molecular marker; lanes 1-5: *V. alginolyticus* 22082, *V. alginolyticus* 22083, *V. alginolyticus* 22084, *V. alginolyticus* 24045, *V. alginolyticus* 24047 ตามลำดับ



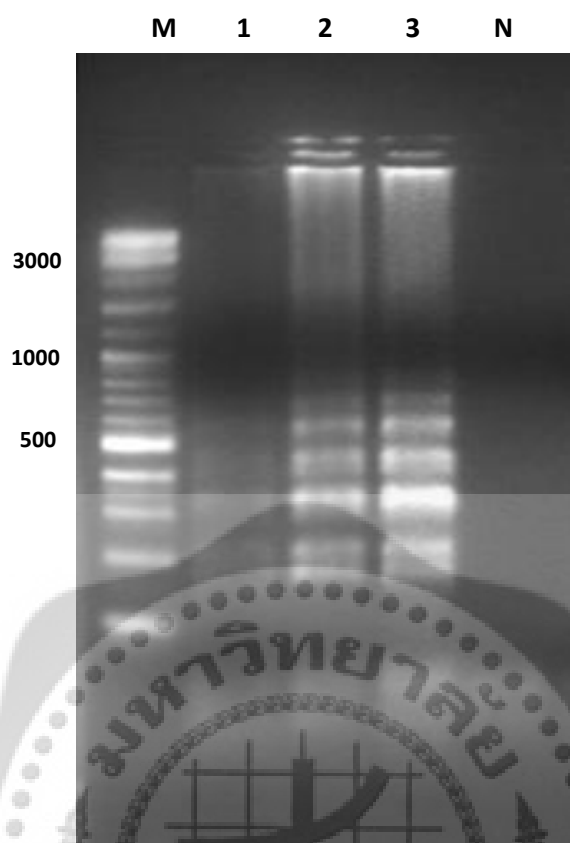
ภาพประกอบ 25 แสดงการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ยีน *gyrB* เป็นยีนเป้าหมาย; Lane M: molecular marker; lanes 1-5: *V. alginolyticus* 22082, *V. alginolyticus* 22083, *V. alginolyticus* 22084, *V. alginolyticus* 24045, *V. alginolyticus* 24047 ตามลำดับ

2.3 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำ LAMP-*V. alginolyticus*

จากการทดลองทำ LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *rpoX* ของ *V. alginolyticus* โดยใช้อุณหภูมิและเวลาที่ต่างๆ กันพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ LAMP reaction คือ 60°C เมื่อทดลองใช้เวลา 60 นาที (ภาพประกอบ 26) เนื่องจากให้ผลชัดเจนที่สุด ส่วนการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำ LAMP reaction พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 60 นาที เมื่อใช้ อุณหภูมิ 60°C ในการทำปฏิกิริยาดังแสดงในภาพประกอบ 27



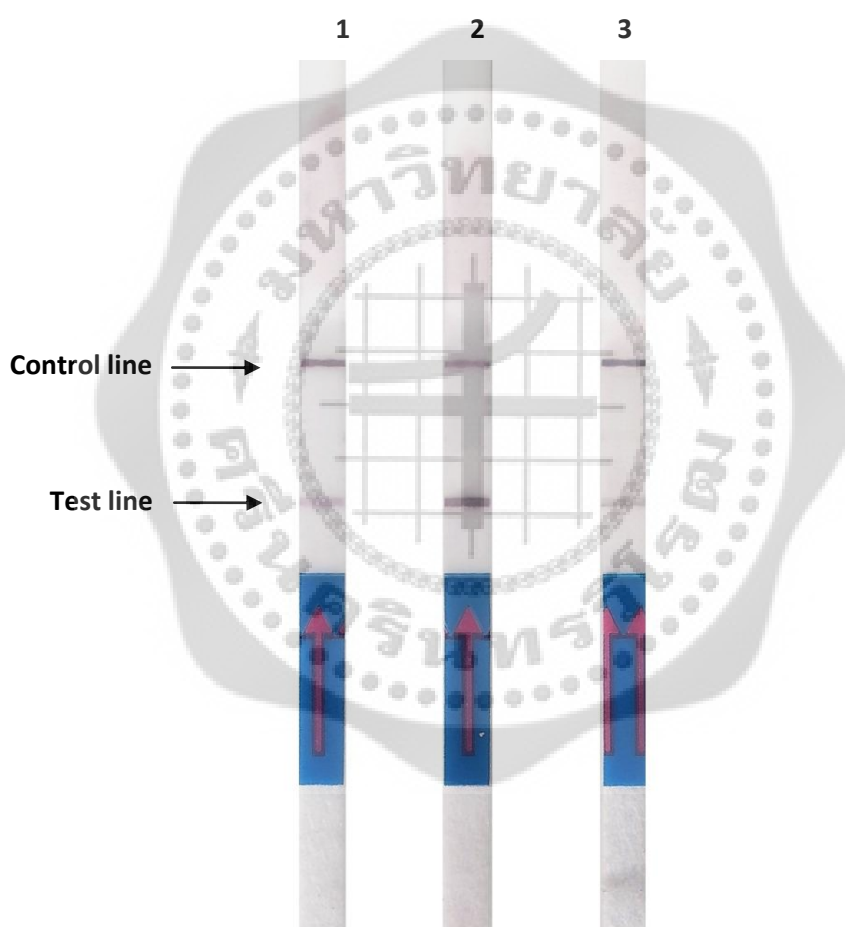
ภาพประกอบ 26 แสดงการทำ LAMP ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อทดลองใช้เวลา 60 นาที; Lane 1: 60°C; lane 2: 63°C; lane 3: 65°C; lane N: no template (negative control)



ภาพประกอบ 27 แสดงการทำ LAMP ที่เวลาต่างๆ เมื่อใช้อุณหภูมิ 60°C; Lane M: molecular marker; lane 1: 30 นาที; lane 2: 45 นาที; lane 3: 60 นาที; lane N: no template (negative control)

2.4 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ probe ที่ติดฉลากด้วย FITC ในการวิเคราะห์ LAMP product ด้วยวิธี Lateral flow dipstick

ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ probe จะเลือกจากปริมาณของ DNA probe ที่แตกต่างกันคือ 200, 20 และ 2 พิโคโมล จากการทดลองหลังจากนำ LAMP product ไปป้อนกับ DNA probe ที่อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 5 นาที พบว่าปริมาณของ DNA probe ที่แสดงปฏิกิริยาบนแผ่น LFD ที่เห็นแถบของ test line ที่เข้มและชัดเจนที่สุดคือ 20 พิโคโมล (ภาพประกอบ 28)



ภาพประกอบ 28 แสดงการทำ LAMP-LFD โดยใช้ DNA probe ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 2, 20 และ 200 พิโคโมล; Lane 1: ใช้ปริมาณของ DNA probe 2 พิโคโมล; Lane 2: ใช้ปริมาณของ DNA probe 20 พิโคโมล; Lane 3: ใช้ปริมาณของ DNA probe 200 พิโคโมล

2.5 ความจำเพาะในการตรวจเชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยเทคนิค LAMP และ

PCR

จากการตรวจความจำเพาะในตรวจ *V. alginolyticus* ด้วย LAMP และ PCR พบว่าสามารถตรวจ *V. alginolyticus* ได้ทุก isolates ที่ทดสอบโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (ตาราง 7)

ตาราง 7 แสดงแบคทีเรีย isolates ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

Bacterial isolates	Origin	DNA amplification		Source
		<i>rpoX</i>		
		LAMP	PCR	
<i>Vibrio alginolyticus</i> (n=21)				
<i>V. alginolyticus</i> 22082	Stool	+	+	DMST
<i>V. alginolyticus</i> 22083	Stool	+	+	DMST
<i>V. alginolyticus</i> 22084	Stool	+	+	DMST
<i>V. alginolyticus</i> 24045	Food	+	+	DMST
<i>V. alginolyticus</i> 24047	Stool	+	+	DMST
<i>V. alginolyticus</i> 24048	Water	+	+	DMST
<i>V. alginolyticus</i> 14800	Seafood	+	+	DMSC
<i>V. alginolyticus</i> Y4	Seawater	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> Y16	Shrimp pond	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> Y17	Shrimp pond	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> Y18	Shrimp pond	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> S24	Shrimp	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU1	Crab	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU2	Crab	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU3	Crab	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU4	Cockle	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU5	Cockle	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU6	Mussel	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU7	Mussel	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU8	Mussel	+	+	SWU
<i>V. alginolyticus</i> SWU9	Oyster	+	+	SWU
<i>V. harveyi</i> (n=3)				
<i>V. harveyi</i> 22888	Unknow	-	-	GB
<i>V. harveyi</i> 639	<i>P. monodon</i>	-	-	CENTEX
<i>V. harveyi</i> 1526	<i>P. monodon</i>	-	-	CENTEX
<i>V. cholera</i> (n=4)				
<i>V. cholera</i> 22117	Stool	-	-	DMST
<i>V. cholera</i> 22141	Food	-	-	DMST
<i>V. cholera</i> 22125	Rectal swab	-	-	DMST
<i>V. cholera</i> 4907013	<i>P. vannamei</i>	-	-	SWU
<i>V. parahaemolyticus</i> (n=4)				
<i>V. parahaemolyticus</i> 20245	Unknow	-	-	DMST

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Bacterial isolates	Origin	DNA amplification		Source
		<i>rpoX</i>		
		LAMP	PCR	
<i>V. parahaemolyticus</i> 21243	Unknow	-	-	DMST
<i>V. parahaemolyticus</i> 21330	Stool	-	-	DMST
<i>V. parahaemolyticus</i> 23796	Stool	-	-	DMST
<i>V. vulnificus</i> (n=3)				
<i>V. vulnificus</i> 22441	Hemoculture	-	-	DMST
<i>V. vulnificus</i> 27426	Blood	-	-	DMST
<i>V. vulnificus</i> 27427	Unknow	-	-	DMST
<i>V. mimicus</i> (n=3)				
<i>V. mimicus</i> 22090	Food	-	-	DMST
<i>V. mimicus</i> 24053	Food	-	-	DMST
<i>V. mimicus</i> 24054	Water	-	-	DMST
<i>V. campbellii</i> (n=2)				
<i>V. campbellii</i> 21361	Unknow	-	-	GB
<i>V. campbellii</i> 21363	Unknow	-	-	GB
<i>V. anguillarum</i> AVL01 (n=1)	Unknow	-	-	DABU
<i>V. ordalii</i> VIB02 (n=1)	Unknow	-	-	DABU
<i>V. shilonii</i> 4907012 (n=1)	<i>P. vannamei</i>	-	-	SWU
Other non-Vibrio bacteria (n = 15)		-	-	

CENTEX = Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand.

CPF = Charoen Pokphand Foods Public Co. Ltd., Thailand

DABU = Department of Aquatic Science, Burapa University, Thailand.

DMSM = Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand.

DMST = Department of Medical Science, Ministry of Public Health Thailand.

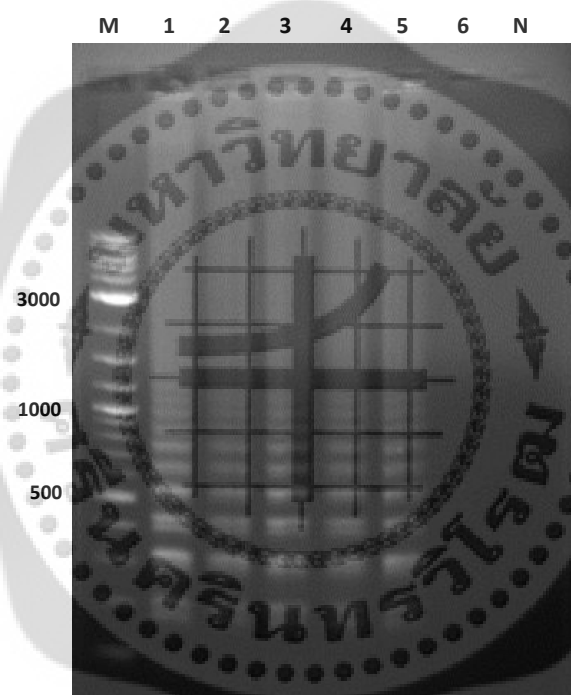
GB = Ghent University, Belgium

SWU = Department of Biology, Srinakharinwirot University, Thailand

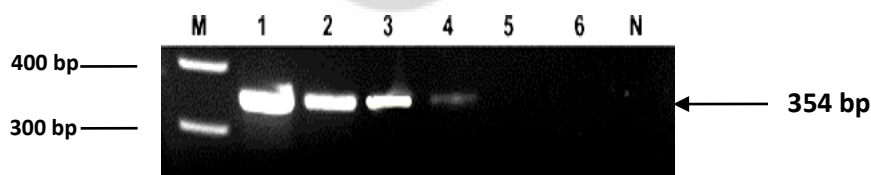
2.6 การศึกษาความไวในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในสภาพเชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค LAMP-LFD และ PCR

ทำการทดสอบแบคทีเรียตัวอย่าง *V. alginolyticus* S24 กับเชื้อที่เลี้ยงแบบบริสุทธิ์ (pure culture) แล้วมาสกัด DNA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Yamazaki; et al. (2008) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา LAMP และ PCR พบว่าเทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 1.8×10^2 CFU ml⁻¹ หรือ 0.6 CFU reaction⁻¹ ดังแสดงในภาพประกอบ 29 ก ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ LAMP-LFD ดังแสดงในภาพประกอบ 30 ส่วนเทคนิค PCR มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 1.8×10^3 CFU ml⁻¹ หรือ 6 CFU reaction⁻¹ ดังแสดงในภาพประกอบ 29 ข

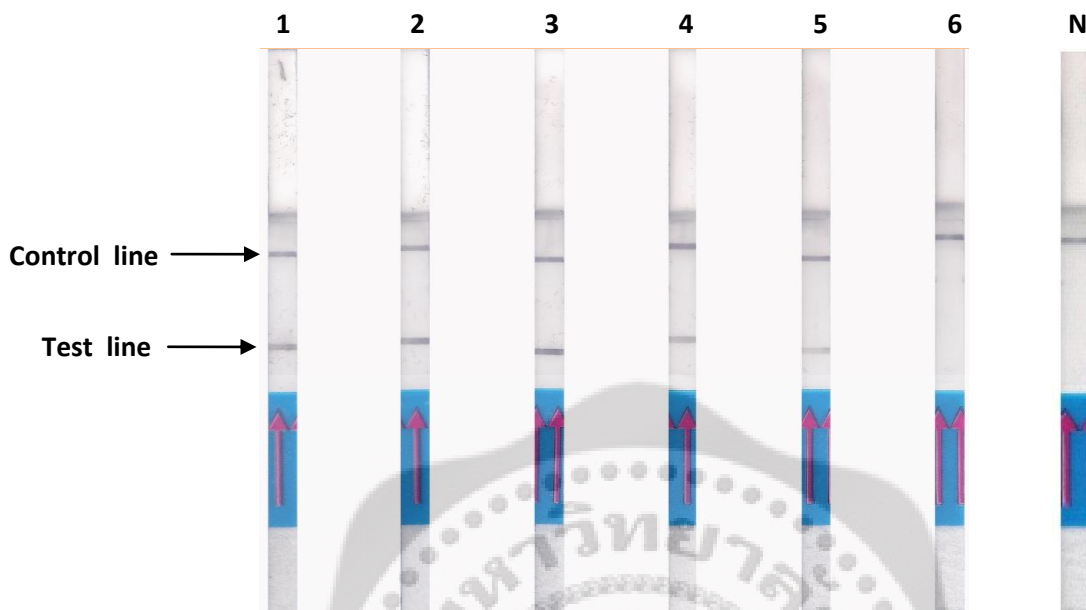
ก



ข



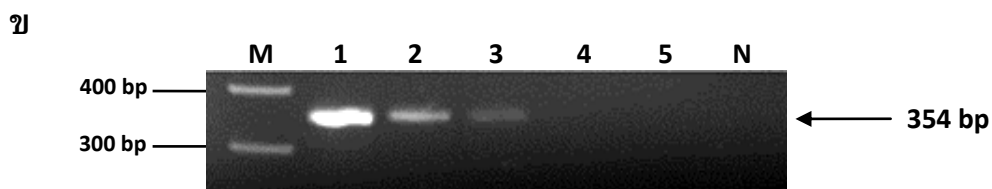
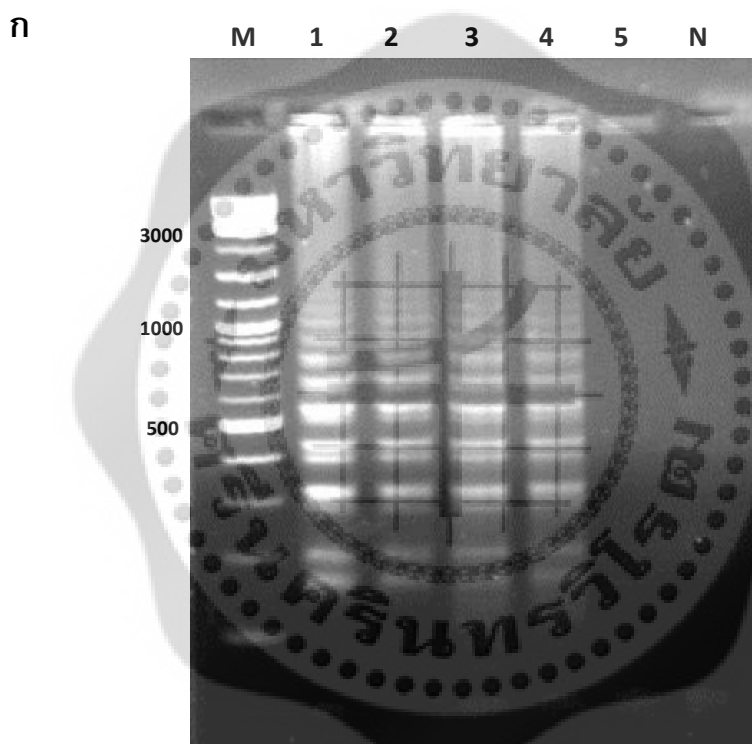
ภาพประกอบ 29 แสดงการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในสภาพเชื้อที่เลี้ยงแบบบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยเทคนิค LAMP (ก) และ PCR (ข); Lane M: molecular marker; lane 1-6: ความเข้มข้นของเชื้อจาก 1.8×10^6 CFU ml⁻¹ ถึง 1.8×10 CFU ml⁻¹ ตามลำดับ; lane N: no template (negative control)



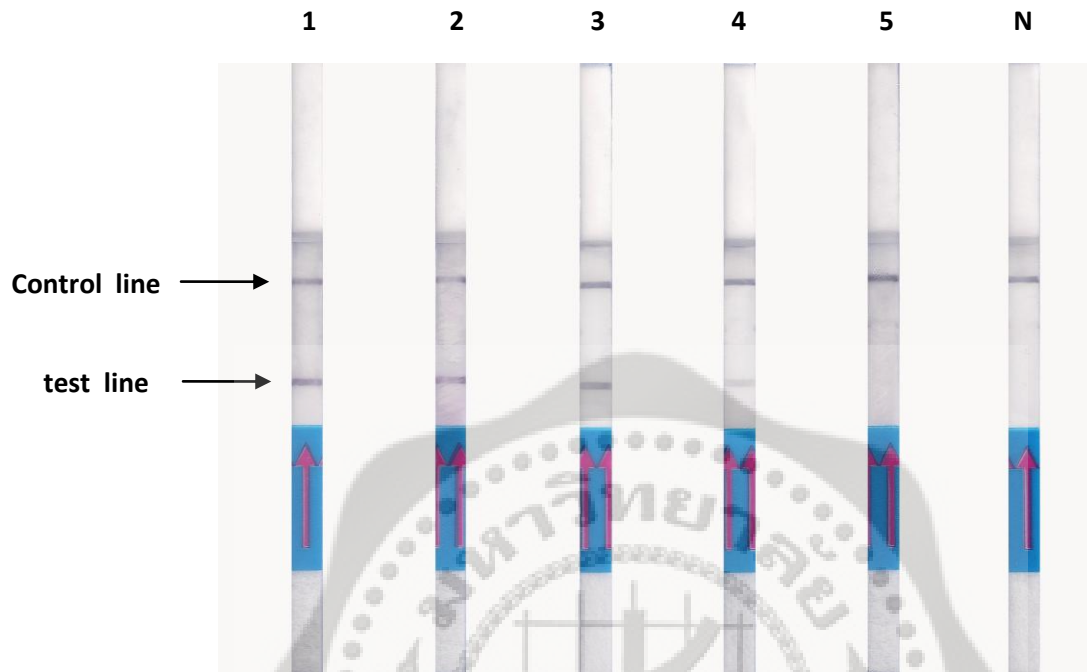
ภาพประกอบ 30 แสดงความไวในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในสภาพ pure culture ด้วยเทคนิค LAMP-LFD; Lane 1-6: ความเข้มข้นของเชื้อจาก 1.8×10^6 CFU ml⁻¹ ถึง 1.8×10 CFU ml⁻¹ ตามลำดับ; lane N: no template (negative control)

2.7 การศึกษาความไวในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างของ กุ้งที่เติมเชื้อ (spiking) ด้วยเทคนิค LAMP-LFD และ PCR

เมื่อนำแบคทีเรียตัวอย่าง *V. alginolyticus* S24 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เติมลงในตัวอย่างกุ้ง (spiking) แล้วมาสกัด DNA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Yamazaki; et al. (2008) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา LAMP และ PCR พบว่าเทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 2×10^3 CFU g⁻¹ หรือ 4 CFU reaction⁻¹ ดังแสดงในภาพประกอบ 31 ก ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ LAMP-LFD ดังแสดงในภาพประกอบ 32 ส่วนเทคนิค PCR มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 2×10^4 CFU ml⁻¹ หรือ 40 CFU reaction⁻¹ ดังแสดงในภาพประกอบ 31 ข



ภาพประกอบ 31 แสดงการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างของกุ้งที่เติมเชื้อ (spiking) ด้วยเทคนิค LAMP (ก) และ PCR (ข); Lane M: molecular marker; lane 1-5: ความเข้มข้นของเชื้อจาก 2×10^6 CFU g⁻¹ ถึง 2×10^2 CFU g⁻¹ ตามลำดับ; lane N: no template (negative control)



ภาพประกอบ 32 แสดงการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างของกุ้งที่เติมเชื้อ (spiking) ด้วยเทคนิค LAMP-LFD; Lane 1-5: ความเข้มข้นของเชื้อจาก 2×10^6 CFU g⁻¹ ถึง 2×10^2 CFU g⁻¹ ตามลำดับ; lane N: no template (negative control)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งขาว สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสกัด RNA ของไวรัสในเนื้อเยื่อกุ้งด้วยชุดสกัด High pure viral nucleic acid kit ซึ่งวิธีนี้สามารถสกัด RNA ของไวรัสได้อย่างรวดเร็วและมีขั้นตอนการทำที่ง่าย การออกแบบ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-LAMP ทำการออกแบบจากบริเวณยีนที่ถอดรหัสเป็น capsid protein (GenBank accession no. AY570982) ได้ primer 4 เส้น คือ F3 primer (5'-TGTTATTGAGTACTCTATTTCC-3') B3 primer (5'-TTTAATACGTACCGATTGTGG-3') FIP primer (5'GTATGCTCCAGCTGTTCCCTGGT TTTCACTAA TTCAGAGCAATGTGG-3') และ BIP primer (5'-CCTGAAACACTAACAGTTAACTGGGTTTT GATGTCCGTTTTCAAGTAGC-3')

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-LAMP มีการทดลองที่อุณหภูมิต่างๆ กันได้แก่ 60°C 63°C และ 65 °C เป็นเวลา 60 นาที พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 65 °C เนื่องจากแถบ DNA ของ RT-LAMP product ที่เกิดขึ้นมีความเข้มและคมชัดมากที่สุด ส่วนงานวิจัยของพุทธรวิบูลย์ และคนอื่นๆ (Puthawibol; et al. 2009: 27-31) ทำการศึกษาการตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งขาว ด้วยเทคนิค RT-LAMP โดยใช้ยีน RNA dependent RNA polymerase (RdRp) เป็นยีนเป้าหมายก็ได้ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 60°C 63°C และ 65 °C เช่นกัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 63 °C เป็นเวลา 60 นาที เช่นเดียวกับงานวิจัยของ นิมิตรภาค และคนอื่นๆ (Nimitphak; et al. 2008: 56-60) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP คือ 63 °C เป็นเวลา 60 นาที

ในการเปรียบเทียบความไวในการตรวจสอบเชื้อ IMNV ระหว่างเทคนิค RT-LAMP กับเทคนิค RT-PCR ซึ่งการทำ RT-PCR ใช้ F3 และ B3 primers โดยใช้ RNA ของไวรัสที่สกัดจากเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ IMNV เป็น template พบว่าเทคนิค RT-LAMP มีความไวในการตรวจการติดเชื้อ IMNV มากกว่า RT-PCR ถึง 100 เท่าซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของโคโน และคนอื่นๆ (Kono; et al. 2004: 59-65) ซึ่งนำเทคนิค RT-LAMP มาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) พบว่ามีความไวในการตรวจสอบมากกว่าเทคนิค PCR อยู่ 10 เท่า และมีความไวเทียบเท่ากับเทคนิค nested RT-PCR และงานวิจัยของพุทธรวิบูลย์ และคนอื่นๆ (Puthawibol; et al. 2009: 27-31) พบว่าเทคนิค LAMP มีความไวเทียบเท่ากับเทคนิค nested RT-PCR

ส่วนการหาปริมาณของ RNA ที่น้อยที่สุดที่เทคนิค RT-LAMP สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ได้โดยใช้ RNA ที่สังเคราะห์ได้ในหลอดทดลอง (*in vitro* transcription) มาเป็น template พบว่าสามารถตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ได้เมื่อมีปริมาณ 3800 copies ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบต่ำกว่างานวิจัยของแอนเดรล และคนอื่นๆ (Andrade; et al. 2007: 9-15) ที่กล่าวว่าเทคนิค

real-time RT-PCR สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ได้เมื่อมีปริมาณ 1500 copies และเทคนิค nested RT-PCR สามารถตรวจการติดเชื้อ IMNV ได้เมื่อมีปริมาณเพียง 10 copies ส่วนงานวิจัยของพุทธิวิบูลย์ และคนอื่นๆ (Puthawibol; et al. 2009: 27-31) สามารถตรวจการติดเชื้อ IMNV ได้เมื่อมีการติดเชื้อเพียง 2 copies จากงานวิจัยการทำ RT-LAMP ครั้งนี้ พบว่ามีความไวในการตรวจสอบการติดเชื้อน้อย กล่าวคือกึ่งต้องมีปริมาณของเชื้อ IMNV มากถึง 3800 copies จึงสามารถตรวจสอบได้ ซึ่งอาจทำให้เกิดจากในการทำปฏิกิริยา LAMP ไม่ได้มีการออกแบบ loop primer ในการทำปฏิกิริยาทำให้มีความไวในการตรวจสอบต่ำ ได้มีรายงานว่าการใช้ loop primer สามารถช่วยเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาให้รวดเร็วยิ่งขึ้น ดังงานวิจัยของพุทธิวิบูลย์ และคนอื่นๆ (Puthawibol; et al. 2009: 27-31) พบว่าถ้าใช้ loop primer จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้นคือ ใช้เวลาเพียง 30 นาที สามารถเกิด LAMP product ขึ้นได้ แต่สาเหตุที่ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่ได้นำ loop primer มาใช้ เนื่องจากเมื่อทดลองทำปฏิกิริยา RT-LAMP โดยไม่ใส่ RNA template ของ IMNV (negative control) พบว่าเกิดผลบวกปลอมขึ้นในหลอดทดลอง ดังที่เคยมีรายงานในการตรวจการติดเชื้อ extra small virus (XSV) ในกุ้ง (Pillai; et al. 2006: 275-283)

การหาความจำเพาะในตรวจสอบการติดเชื้อ IMNV ด้วยเทคนิค RT-LAMP ในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่ามีความจำเพาะสูง เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับไวรัส ชนิดอื่นๆ ที่พบได้บ่อยในกุ้ง เช่น White spot syndrome virus (WSSV), Taura syndrome virus (TSV), monodonbaculovirus (MBV), *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) และ yellow head virus (YHV) เช่นเดียวกับงานวิจัยของพุทธิวิบูลย์ และคนอื่นๆ (Puthawibol; et al. 2009: 27-31) ในการตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งขาว และงานวิจัยของเกียรติปฐมชัย และคนอื่นๆ (Kiatpathomchai; et al. 2008: 214-217) ในการตรวจการติดเชื้อ TSV ในกุ้ง

การตรวจการติดเชื้อ IMNV ในกุ้งขาว *P. vannamei* มีผู้พัฒนาเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิค *in situ* hybridization (ISH) (Tang; et al. 2005: 261–265), RT-PCR, nested RT-PCR (Poulos; et al. 2006: 69-72), real-time RT-PCR (Andrade; et al. 2007: 9-15) แต่เทคนิคเหล่านี้ต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน และต้องใช้เครื่องมือราคาแพงดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) มาใช้ตรวจสอบเชื้อ IMNV ซึ่งประสบผลสำเร็จ เนื่องจากเทคนิค RT-LAMP ทำได้ง่าย ใช้เวลาไม่นานในการตรวจสอบ และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ดังเช่นเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้น อีกทั้งสามารถใช้ RNA เป็น template ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยการเกิดปฏิกิริยาจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase และ *Bst* DNA polymerase ได้ในหลอดเดียวกันภายใต้อุณหภูมิเดียวซึ่งคงที่ (Notomi; et al. 2000: 63)

งานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยเทคนิค LAMP โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อยีน *rpoX* ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสได้ *rpoS*-like sigma factor (RpoX) จัดอยู่ในกลุ่มของ alternative sigma factor ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อความเครียด และเกี่ยวข้องกับการสร้าง biofilm ของแบคทีเรีย (Zhao; et al. 2009: 1-9) ในการตรวจการติดเชื้อ

V. alginolyticus ในกุ้งขาว มีการนำ DNA ของแบคทีเรีย isolate ต่างๆ มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ยีน *rpoX* เป็นยีนเป้าหมาย ทำปฏิกิริยาตามวิธีการของ โชร์และคนอื่นๆ (Zhao; et al. 2011: 137-141) ซึ่งมีขนาด PCR product คือ 354 bp และทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ยีน *gyrB* เป็นยีนเป้าหมายทำปฏิกิริยาตามวิธีการของซัวร์ และคนอื่นๆ (Zhou; et al. 2007: 1897-1906) ซึ่งมีขนาด PCR product คือ 340 bp พบว่าให้ผลบวกในทุก isolate ของ แบคทีเรีย *V. alginolyticus* และให้ผลลบในแบคทีเรียชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่แบคทีเรีย *V. alginolyticus*

การตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ด้วยเทคนิค LAMP มีการออกแบบ primers จากบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoX* (GenBank accession no.FJ358498.1) ได้ primers 4 เส้น คือ F3 primer (5'-GATGTATCGACCACTGCG-3') B3 primer (5'-CTATTTCCGACAAAGTTTT CAC-3') FIP primer (5'-CTGGTTTTCCAGTCTTGTGTGGTTTTTCATTTGTTCTTGAAC TGTG-3') และ BIP primer (5'-AACCTTGCCAACTAAGTTGCATTTTTCTCTGGTCAAAT AATCC GAATC-3')

สำหรับอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยา LAMP คือ 60°C เป็นเวลา 60 นาที เพราะแถบของ DNA มีความเข้มและชัดเจนที่สุด เนื่องจากงานวิจัยนี้มีการวิเคราะห์ LAMP product ด้วยเทคนิค LFD จึงทำการติดฉลาก FIP primer ด้วย biotin และออกแบบ probe ที่ติดฉลากด้วย FITC ในการเกิดปฏิกิริยา LFD ต้องทำการเลือกปริมาณของ DNA probe ที่เหมาะสม โดยเลือกจากปริมาณของ DNA probe ที่แตกต่างกันคือ 200, 20 และ 2 พิโคโมล พบว่าปริมาณของ DNA probe ที่เหมาะสมคือ 20 พิโคโมล เพราะแสดงปฏิกิริยาบนแผ่น LFD ที่เห็นแถบของ test line เข้มและชัดเจนที่สุดซึ่ง DNA probe ที่มีปริมาณน้อย เกิดการจับกับ LAMP product ได้น้อย ทำให้การจับกันของ anti-FITC ที่ติดด้วย colloidal gold กับ DNA probe ที่ติดด้วย FITC เกิดขึ้นน้อยจึงเห็นสีที่ test line จาง ส่วน DNA probe ที่มากเกินไปเป็นการสิ้นเปลือง เพราะไม่ได้เป็นการช่วยเพิ่มความเข้มของแถบ test line แต่จะไปมีผลต่อแถบของ control line ให้เห็นแถบสีเข้มขึ้นแทน เนื่องจาก FITC probe ที่มากเกินไปเคลื่อนที่ไปสู่ control line เพื่อไปจับกับ 2° antibody ที่จำเพาะต่อ anti-FITC antibody (Kiatpathomchai; et al. 2008: 214-217) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของพรหมภมร และคนอื่นๆ (Prompamorn; et al. 2011: 344-351) ที่ทำการตรวจการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้ง พบว่า DNA probe ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LFD คือ 20 พิโคโมล

ในการทดสอบหาความไวในการตรวจสอบแบคทีเรียตัวอย่าง *V. alginolyticus* ที่เลี้ยงแบบบริสุทธิ์ (pure culture) และแบคทีเรีย *V. alginolyticus* ที่เติมในตัวอย่างกุ้ง (spiking) จากการทดลองพบว่าใน pure culture เทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 1.8×10^2 CFU ml⁻¹ หรือ 0.6 CFU reaction⁻¹ ส่วนเทคนิค PCR มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 1.8×10^3 CFU ml⁻¹ หรือ 6 CFU reaction⁻¹ แสดงว่าเทคนิค LAMP มีความไวมากกว่า PCR 10 เท่า และการทดลอง spiking พบว่าเทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 2×10^3 CFU g⁻¹ หรือ 4 CFU reaction⁻¹ ส่วนเทคนิค PCR มีความไวในการตรวจสอบเชื้อที่ 2×10^4 CFU g⁻¹ หรือ 40 CFU

reaction⁻¹ แสดงว่าเทคนิค LAMP มีความไวมากกว่า PCR 10 เท่า เช่นกัน แต่ความไวในการตรวจการติดเชื้อใน pure culture จะมีความไวมากกว่าใน spiking เนื่องจากในตัวอย่างกึ่งที่มีการเติมเชื้ออาจมี inhibitor ต่างๆ ที่พบได้ในตัวอย่างอาหาร ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของสุรสิลป์ และคนอื่นๆ (Surasilp; et al. 2011: 158-163) และพรอมภมร และคนอื่นๆ (Prompamorn; et al. 2011: 344-351) คือ ใน pure culture จะมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าใน spiking และเทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบเชื้อมากกว่าเทคนิค PCR จากผลการตรวจสอบทั้งเชื้อที่เลี้ยงแบบ pure culture และแบบ spiking เมื่อนำ LAMP product ที่ได้มาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี LFD พบว่าให้ผลเหมือนกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis และผลจากงานวิจัยนี้มีความไวในการตรวจเชื้อ *V. alginolyticus* มากกว่างานวิจัยของไคน์ และคนอื่นๆ (Cai; et al. 2010: 67-74) ที่ทำการตรวจเชื้อ *V. alginolyticus* ในปลาทะเลที่เป็นโรค vibriosis โดยใช้ยีน *gyrB* เป็น ยีนเป้าหมาย พบว่าสามารถตรวจการติดเชื้อได้ที่ 3.7×10^2 CFU g⁻¹ หรือ 3.7 CFU reaction⁻¹ และงานวิจัยของ ศรีสุข และคนอื่นๆ (Srisuk; et al. 2010: 36-42) ทำการตรวจการติดเชื้อ *V. cholera* ในตัวอย่างกึ่งที่ทำการ spiking พบว่าสามารถตรวจการติดเชื้อได้ที่ 20 CFU reaction⁻¹ เทคนิค LAMP-LFD ในงานวิจัยนี้สามารถตรวจสอบเชื้อ *V. alginolyticus* ได้ทั้ง 21 isolates และ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสโอและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงมีความเหมาะสมในการนำมาตรวจเชื้อ *V. alginolyticus*

งานวิจัยนี้ได้มีการนำเทคนิค LFD มาใช้ร่วมกับเทคนิค LAMP เพื่อทำการวิเคราะห์ผลของ LAMP product ซึ่งสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาเพียง 5 นาที สามารถตรวจสอบผลได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องดูผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต รวมถึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง เช่น เครื่อง gel electrophoresis เครื่องถ่ายภาพ gel และเครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต (UV transilluminator) เป็นการช่วยประหยัดเวลา และง่ายในการตรวจสอบ อีกทั้งเป็นการหลีกเลี่ยงสารที่ก่อมะเร็งอย่าง ethidium bromide จากการ run gel electrophoresis

มีงานวิจัยหลายรายงานที่ได้นำเทคนิค LFD มาประยุกต์ใช้ร่วมกับ LAMP เช่น การตรวจสอบเชื้อไวรัส Taura syndrome virus (TSV) ในกุ้ง (Kiatpathomchai; et al. 2007: 214-217), การตรวจสอบเชื้อ Infectious myonecrosis virus (IMNV) ในกุ้งขาว (Puthawibool; et al. 2009: 27-31) การตรวจหาการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งขาว (Prompamorn; et al. 2011: 344-351) และ การตรวจหาการติดเชื้อ *V. vulnificus* ในหอยนางรม (Surasilp; et al. 2011: 158-163) เป็นต้น

การวิเคราะห์ LAMP product นอกจากวิธี gel electrophoresis และวิธี LFD แล้วก็ยังมีอีกหลายวิธี เช่น การดูความขุ่นโดยดูผลของปฏิกิริยาจากตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate (Mori; et al. 2001: 150-154) การดูสีของสารเรืองแสงโดยใช้สารเรืองแสง เช่น SYBR Green I ดังงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการตรวจการติดเชื้อ *V. alginolyticus* ในปลาทะเลด้วยเทคนิค LAMP และมีการนำวิธี SYBR Green I มาใช้วิเคราะห์ LAMP product ปรากฏว่าถ้ามี LAMP product เกิดขึ้นในหลอดทดลองหลังจากเติม SYBR Green I ลงไปจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว แต่

วิธีนี้มีความจำเพาะน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ LFD เพราะ SYBR Green I จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่าง double strand DNA ดังนั้นแม้ว่าจะมี product ที่เป็น non-specific เกิดขึ้น SYBR Green I ก็จะไปจับได้เช่นกัน ก่อให้เกิดผลบวกปลอม ทำให้งานวิจัยนี้เลือกใช้วิธี LFD เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง เนื่องจากการออกแบบ DNA probe ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายในการทำปฏิกิริยา LAMP ซึ่งมีความจำเพาะกว่าวิธีอื่นๆ

เทคนิค LAMP ที่ใช้ตรวจการติดเชื้อทั้ง IMNV และ *V. alginolyticus* ในงานวิจัยนี้ สามารถตรวจการติดเชื้อในกุ้งขาวได้สำเร็จ โดยเทคนิค LAMP ที่ใช้นี้มีความไวในการตรวจสอบมากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 10 -100 เท่า เทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสหรือแบคทีเรียชนิดอื่นๆ สามารถทำปฏิกิริยาได้เพียงขั้นตอนเดียว (one step) โดยใช้อุณหภูมิเดียวคงที่ และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง เช่น เครื่อง thermal cycler





บรรณานุกรม

- ชลอ ลี้มสุวรรณ. (2543). *กุ้งไทย 2000*. กรุงเทพฯ: เจริญรัฐการพิมพ์. ไม่ปรากฏเลขหน้า
- ชลอ ลี้มสุวรรณ; และ พรเลิศ จันทร์รัชกุล. (2547). *อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: เมจิคพับบลิเคชัน. ไม่ปรากฏเลขหน้า
- ชัยวุฒิ สุตทองคง. (2550). โรคกล้ามเนื้อตายจากการติดเชื้อ IMNV. ในวารสารศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสมุทรสาคร. หน้า 1-5.
- ชัยวุฒิ สุตทองคง; ธิดาพร ฉวีภักดิ์; และลิลลา เรืองแป้น. (2550). *ประวัติและปริมาณแบคทีเรีย Vibrio spp. ในกุ้งขาวแวนนาไม, Penaeus vannamei ที่เลี้ยงในบ่อดินเรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 45: สาขาประมง*. หน้า 280-292.
- ชัยวุฒิ สุตทองคง; และธิดาพร ฉวีภักดิ์. (2550). *การศึกษาการติดเชื้อ Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) ในกุ้งขาวแวนนาไม (Penaeus vannamei) ในประเทศไทย*. บทคัดย่อสัมมนาวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจำปี 2550 ณ โรงแรมเนาว์ดำแกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี วันที่ 10-14 มิถุนายน 2550. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกรมประมง. หน้า 6-7.
- ถนอมจิตร สิริภคพร. (2555). *สัญญาณเดือนกษัย...ราคากุ้งตกต่ำปี 2555*. ในวารสารส่วนเศรษฐกิจภาคธนาคารแห่งประเทศไทยสำนักงานภาคใต้. หน้า 1-2.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์. (2545). ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียส แวนนาไม (ตอนที่ 2). ในวารสารสัตว์น้ำ (14): 121-124.
- ทินรัตน์ ศรีสุวรรณ. (2551). *คู่มือการตรวจและวินิจฉัยโรคในกุ้งทะเล*. ในวารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. หน้า 81-126.
- มาลินี วิชชาวุธ; และสมยศ สิทธิโชคพันธ์. (2548). *การนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวตามระเบียบ.กรมประมง*. วารสารการประมง. ฉบับที่58 หน้า 170-171.
- อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ. (2536). *การศึกษาชนิดของไวรัสไอและการตกค้างของยาออกโซลิติกแอซิดในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อ*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.
- อภิรักษ์ ดันศิริสิทธิกุล. (2548). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ Vibrio alginolyticus*. วิทยานิพนธ์วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- อารีรัตน์ คุณานพรัตน์.(2552). *การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ Infectious Myonecrosis Virus (IMNV)*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

- Alsina, M.; & Blanch, A.R. (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*. 76: 79-85.
- Andrade; et al. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*. 264: 9-15.
- Anderson, I.G.; Shamsudin, M. N.; & M. Shariff. (1988). Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackish water ponds. *Asian Fish Science*. 2: 93-108.
- Aznar, R.; Ludwig, W.; & Schleifer, K. H. (1993). Ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Vibrio vulnificus* biotypes. *Systematic and Applied Microbiology*. 16: 303 -309.
- Bachere, E. (2000). Introduction shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191: 3-11.
- Baumann, P., Baumann, L.; & Mandell, M. (1971). Taxonomy of marine bacteria: the genus *Benekea*. *Journal of Bacteriology*. 107: 268-294.
- Baumann, P.; & Shubert, R.H.W. (1984). Family II. *Vibrionaceae*. In: Krieg N.R., Holt J.G., eds, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1, The Williams and Wilkins, Baltimore. 516-550.
- Boone. (1931) *Penaeus vannamei*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 63: 173.
- Cai; et al. (2010). loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Vibrio alginolyticus*, the causative agent of vibriosis in mariculture fish. *Letters in Applied Microbiology*. 50: 480-485.
- Chaivisuthangkura, P; et al. (2009). Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*. 162: 188-193.
- Chen, S. N.; Huang, S. L.; & Kou, G.H. (1992). Studies on the epizootiology and Pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawns, *Penaeus monodon* in Taiwan. In: Fulks W, Main KL (eds) *Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States*. The Oceanic Institute, Honolulu: 195-205.
- Chou, P; et al. (2011). Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based probes. *Journal of Virological Methods*. 173: 67-74.

- Costa, R.; et al. (1998). Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) In New Caledonia. *Aquaculture*. 164: 297–309.
- Dalsgaard, A.; & Hoi, L. (1997). Prevalence and characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from shrimp products imported into Denmark. *Journal of Food Protection*. 60: 1132-1135.
- De la Pena, L.D.; et al. (1993). Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 115: 1-12.
- Diggles, B.K.; et al. (2000). Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Disease of Aquatic Organisms*. 43: 127-137.
- Di-Pinto, A.; et al. (2005). A collagenase- targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*. 68: 150-153.
- Esteve, M.; & Herrera, F.C. (2000) Hepatopancreatic alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1939) (Crustacea:Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. *Journal of Invertebrate Pathology*. 76: 1-5.
- Flegel, T. W. (1992). Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp disease in Thailand. In: Fulks W, Main KL eds. Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. *Oceanic Institute, Honolulu.*: 57-112.
- Gopal, S.; et al. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 102: 151-159.
- Harris, L. J.; & Owens, L. (1999) Productions of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. *Disease of Aquatic Organisms*. 38: 11-22.
- Holthuis, L.B. (1980). Shrimp and prawns of the world: An annotated catalogue of species of interest to fisheries. *FAO Fisheries Synopsis* 125: 152-271.
- Inglis, V.; Roberts, R. J.; & Bromage, N. R. (1993). *Bacterial Disease of Fish*. New York: Academic Press. unpagged.
- Iwamoto, T.; Sonobe, T.; & Hayashi, K. (2003). Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 2616-2622.

- Jaroenram, W.; Kiatpathomchai, W.; & Flegel, T.W. (2009) Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Molecular and Cellular Probes*.65-70.
- Kiatpathomchai, W.; et al. (2008). Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*. 153: 214-217.
- Kono, T.; Savan, R.; Sakai, M., & Itami, T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*. 115: 59-65.
- Lawhavinit, O.; & Sapsinsoonthon, B. (2005). Study on fungal and bacterial diseases in brood stock white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Proceedings of the JSPS-NRCT International Symposium. Joint Semina: 203-209.
- Lee, K.K.; Yu, S. R.; Chen, F.R.; Yang, T.I.; & Liu, P.C. (1996). Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Current Microbiology*. 32: 229 -231.
- Lightner, D.V. (1995) Taura syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. *In: Proceedings of the United States*. 1-12.
- Lightner, D.V. (1996). *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Los Angeles, USA. unpagued.
- Lightner, D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *Journal of Applied Aquaculture*. 9: 27-52.
- Lightner; D.V.; et al. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*. 7: 85.
- Lightner, D.V.; & Redman, R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201-220.
- Lightner, D.V.; et al. (1992). A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in northwestern Mexico. *ICES Marine Science Symposia*. 194: 97-105.
- Liu, P.; et al. (2004). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology*. 44: 23-28.

- Mari, J.; Bonami, J.R.; & Lightner, D.V. (1993). Partial cloning of the genome of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *Journal of Virological Methods*. 74: 2637-2643.
- Mohney, L.L.; Lightner, D.V.; & Bell, T.A. (1994). An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 25: 116-125.
- Molitoris, S. W.; et al. (1985). Characterization and Distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. *Environment microbiology*. 1388 - 1394.
- Mori, Y.; et al. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289(1): 150-154.
- Mori, Y.; Hirano, T.; & Notomi, T. (2006). Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnology*. 3-6
- Nagamine, K.; Hase, T.; & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop - mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. 16: 223-229.
- Nibert, M.L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a mono segmented double-stranded RNA virus. *Journal of General Virology*. 88: 1315-1318.
- Nimitphak, T.; Kiatpathomchai, W.; & Flegel, T.W. (2008) Shrimp hepatopancreatic parvovirus detection by combining loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*. 154: 56-60.
- Notomi, T.; et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28: 63.
- Overstreet, R.M.; et al. (1997). Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the Gulf of Mexico and the southeastern United States. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69: 165-176.
- Pillai, D.; Bonami, J.R.; & Sri Widada, J. (2006) Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), by loop-mediated isothermal amplification. *Journal Fish Disease*. 29: 275-283.

- Poulos; B. T.; et al. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology*. 87: 987-996.
- Poulos, B.T.; & Lightner, D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Disease of Aquatic Organisms*. 73: 69-72.
- Promptamorn, P.; et al. (2011). The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*. 52(4): 344-351.
- Puthawibool, T.; et al. (2009). Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*. 156: 27–31.
- Robert-Pillot, A.; et al. (2010). Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 143: 190-197.
- Rosenberry, B. (1998). World Shrimp Farming 1998. In Shrimp News International. San Diego, California., USA. 164.
- Rosenberry, B. (2005). *World Shrimp Farming*. In *Shrimp News International*. (online)
- Ruangpan, L.; et al. (1995). Numerical taxonomy of *Vibrio* spp. isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture II (ed. M. Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe), Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. 131-140.
- Sappat, A.; Jaroenram, W.; & Puthawibool, T. (2011) Detection of shrimp Taura syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification using a designed portable multi-channel turbidimeter. *Journal of Virological Methods*. 175: 141-148.
- Senapin S.; et al. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*. 266: 32–38.
- Sindermann, C.J. (1990) Bacteria. In: Principal diseases of marine fish and shellfish, Vol2. Academic Press, San Diego. 41-74.
- Snieszko, S.F. (1973). Diseases of fishes and their control in the U.S. In: The Two Lakes Fifty Fishery Management Training Course Report, pp. 55-56, London: Jansen et al. in Lightner, D.V. & Redman, R.M. 1988. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201-220.

- Srisuk, C.; et al. (2010). Rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification targeted to the gene of outer membrane protein *ompW*. *Letters in Applied Microbiology*. 50(1): 36-42.
- Sudheesh, P.S.; Jie, K.; & Xu, H.S. (2002). Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolated from cultured shrimps. *Aquaculture*. 207: 11-17.
- Surasilp, T.; et al. (2011). Rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* by loop mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to *rpoS* gene. *Molecular and Cellular Probes*. 25: 158-163.
- Tang, K.F.J.; et al. (2005). *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 261-265.
- Tang, K.F.J., & Lightner, D.V. (2000) Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture*. 189: 11-21.
- Teixeira-Lopes, M.A.; et al. (2011). Natural co-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Litopenaeus vannamei* in Brazil. *Aquaculture* 312: 212-216.
- Teng, P.H.; et al. (2007). Specific detection of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification amplicons for Taura syndrome virus by colorimetric dot-blot hybridization. *Journal of Virological Methods* 146: 317-326.
- Thaithongnum, S.; et al. (2006). Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture*. 261: 1-9.
- The principle of LAMP method* (2011). Eiken chemical. Retrieved August, 2011, from <http://www.eiken.co.jp/en>
- Tomita, N.; et al. (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. 3: 877-882.
- Venkateswaran, K.; Dohmoto, N.; & Harayama, S. (1998). Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 681-687.
- Wang, L.; et al. (2011). Application of an improved loop-mediated isothermal amplification detection of *Vibrio parahaemolyticus* from various seafood samples. *African Journal of Microbiology Research*. 31: 5765-5771.

- Wang, C.; et al. (1999). Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of Aquatic Organisms*. 39: 1-11.
- Wang, C.H.; et al. (2000). Ultra structure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Diseases of Aquatic Organisms*. 41: 91-104.
- Weisberg, W.G.; et al. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2): 679-703.
- Xu, H.; et al. (2012). Establishment of universal loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for rapid detection of pathogenic *Vibrio* spp. in aquatic organisms. *African Journal of Microbiology Research*. 6(14): 3447-3454.
- Yamazaki, W.; et al. (2008). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiology*. 8: 163.
- Zhao, J.J.; Chen, C.; & Hu, C.Q. (2009). Cloning, Identification, and Characterization of the rpoS-Like Sigma Factor rpoX from *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-9.
- Zhao, J.J.; et al. (2011). SYBR Green I-based real-time PCR targeting the rpoX gene for sensitive and rapid detection of *Vibrio alginolyticus*. *Molecular and Cellular Probes*. 25(2-3): 137-141.
- Zhou, S.; et al. (2007). Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *Journal of Applied Microbiology*. 1897-1906.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria Bertani broth

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 20 นาที

2. Tryptic soy broth

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

3. Tryptic soy agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	7.5	กรัม
เติมน้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง TCBS (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar)

ชั่ง TCBS 89.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1000.0 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2. 10x TBE (Tris-Borate-EDTA)

Tris base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH 8.0)	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 4M HCl		

3. 1.5 % Agarose Gel

ชั่ง agarose ใส่ในบัฟเฟอร์ TBE (1X) ให้มีความเข้มข้น 1.5% ต้มจน agarose ละลายในบัฟเฟอร์เป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นลง นำไปเทลง gel chamber ที่มี comb ตั้งอยู่เรียบร้อยแล้ว ทิ้งไว้จน agarose แข็งตัวจึงดึง comb ออกและเท TBE (1X) จนท่วม gel เล็กน้อย

4. 2 log DNA ladder ปริมาตร 60 ไมโครลิตร

2 log DNA Ladder	10	ไมโครลิตร
6x Loading dye	10	ไมโครลิตร
เติมน้ำกลั่น	40	ไมโครลิตร

ภาคผนวก ค

1. การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN)

ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ตัดเจลรอบๆ แถบ DNA ที่ต้องการภายใต้แสง UV ซึ่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมบัฟเฟอร์ QG 300 ไมโครลิตร ต่อ 100 มิลลิกรัม ของน้ำหนักเจล (3 เท่าของน้ำหนักเจล) บ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 10 นาที สีของสารละลายจะเหมือนกับสีของบัฟเฟอร์ QG (หากเปลี่ยนสีเติม 3M sodium acetate 10 ไมโครลิตร) จากนั้นเติม isopropanol 500 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายใส่ใน MinElute Spin column นำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ที่ังสารละลายที่ผ่านออกมา และเติม บัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 1 นาทีที่ังสารละลาย ล้างสารที่ ปนเปื้อนทิ้งโดยเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นแยกสารละลายทิ้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ปั่นแยกบัฟเฟอร์ PE ที่ตกค้างอยู่ที่ 16,000 x g นาน 1 นาที แล้วเติม บัฟเฟอร์ EB 12 ไมโครลิตร เพื่อชะเอาดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก column โดยนำไปปั่นอีกครั้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที แล้วเก็บสารละลายใส่ที่ไ้ที่ -20 °C

2. การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด QIAprep Spin Miniprep kit ตามคู่มือของ QIAprep

Miniprep Handbook มีขั้นตอนดังนี้

นำเชื้อที่เตรียมไว้มาปั่นใน microcentrifuge tube ที่ 16,000 x g นาน 2 นาที เก็บตะกอน เชื้อมา resuspend ในบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร และ บัฟเฟอร์ N3 350 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ นำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 10 นาที ดูด supernatant ใส่ ใน QIAprep Spin column นำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ที่ังสารละลายที่ผ่านออกมาและเติม บัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 1 นาทีที่ังสารละลาย ล้างสารที่ ปนเปื้อนทิ้งโดยเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นแยกสารละลายทิ้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ปั่นแยกบัฟเฟอร์ PE ที่ตกค้างอยู่ที่ 16,000 x g นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB 50 ไมโครลิตร เพื่อชะเอาพลาสมิดที่ต้องการออกจาก column โดยนำไปปั่นอีกครั้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที เก็บสารละลายที่ไ้ที่ -20 °C



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวศรัญญา ปลาอ่อน
วันเดือนปีเกิด	28 เมษายน 2531
สถานที่เกิด	ราชบุรี
สถานที่อยู่	23/3 หมู่ที่ 2 ต.ท่าเสา อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี 71120
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2549	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ ราชบุรี จังหวัดราชบุรี
พ.ศ. 2553	วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ
พ.ศ. 2556	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ

