ว.วิทย. มข. 41(3) 518-531 (2556) KKU Sci. J. 41(3) 518-531 (2013)

เชื้อโมโนดอนแบคคิวโลไวรัส: การตรวจสอบการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ

Monodon Baculovirus: The Detection of Infection in *Penaeus monodon*

ดวงแขฑิตา กาญจนโสภา[1]

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อโมโนดอนแบคคิวโลไวรัสในกุ้งกุลาดำ หรือ เอ็มบีวี (MBV; Monodon baculovirus) ไม่ได้ก่อให้เกิดการตายของกุ้งกุลาดำในระยะกุ้งเต็มวัย แต่เป็นสาเหตุทำให้กุ้งเติบโตช้าส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้ง และการติดเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุหลักให้กุ้งระยะ larva, post larva และ juvenile ตายถึง 90% ซึ่งเป็นปัญหาแก่โรงเพาะฟัก การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสทำได้ด้วยการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยตรวจหาก้อนโปรตีน (inclusion body) ในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อนด้วยการทำ squash mount เซลล์ตับและตับอ่อนแล้วย้อมด้วยมาลาไคล์กรีนหรือย้อมด้วยฮีมาโตไซลินและอิโอซินบนเนื้อเยื่อตับที่ตรึงบนแผ่นสไลด์ ในปัจจุบันใช้วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสในระดับชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งวิธีการ PCR ที่พัฒนาโดย Belcher and Young (1998) เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและนิยมใช้ในการตรวจโรคไวรัส MBV ที่ระบาดในประเทศออสเตรเลีย อินเดีย และไทย ต่อมาได้พัฒนาวิธีการตรวจให้มีความแม่นยำขึ้นกว่า PCR เช่น real time PCR และ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เนื่องจากการตรวจเชื้อด้วย PCR ไม่เหมาะสมต่อการตรวจในฟาร์ม ทำให้มีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโดยใช้หลักการทางอิมโมโนวิทยา (immunological method) ด้วยการผลิตแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส เพื่อพัฒนาเป็นแผ่นตรวจไวรัส (immuno-chromatographic strip test) แม้วิธีการตรวจไวรัสด้วยชุดตรวจสอบ จะมีความแม่นยำน้อยกว่าการตรวจด้วย PCR แต่ชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ได้ง่ายในการปฏิบัติงานฟาร์ม ขั้นตอนการใช้ไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงและเกษตรกรสามารถตรวจสอบได้เอง ซึ่งนำไปสู่การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสอย่างยั่งยืน

[1]สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต-สุราษฎร์ธานี ตำบลมะขามเตี้ย อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

E-mail: daungkhae.k@psu.ac.th

ABSTRACT

Monodon baculovirus (MBV) may cause reduction of growth rate and increase of culture period in shrimp. In addition, virus infection in the larva, post larva and juvenile stages shows a high rate of death to 90%. This has indicated very serious in many hatcheries. Diagnosis of MBV was originally accomplished by microscopic observation of inclusion bodies in hapatopancreatic cells via malachite green staining of hepatopancreatic squash mounts or hematoxylin and eosin staining (H&E) of hepatpancreatic tissue sections. Now a day, polymerase chain reaction (PCR) that is more sensitive molecular method has been reported. However, only the method of Belcher and Young (1998) has been found to be reliable for the detection of MBV from Australia, India and Thailand. Recently, other highly sensitive nucleic acid amplification methods were developed, including a real-time PCR method and a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Although PCR-based methods are used widely for the detection of MBV in the laboratory, they are not suitable for pond-side detection by farmers. Simpler immunological methods using monoclonal antibody have been developed into immunochromatographic strip test. Although less sensitive than PCR, antibody-based diagnostic methods trend to be simpler, less expensive and more amenable to use in less well equipped laboratories or by unskilled personnel in the field. It is sustainable to restrict a prevalence of MBV virus.

คำสำคัญ: เชื้อโมโนดอนแบคคิวโลไวรัส เอ็มบีวี กุ้งกุลาดำ

Keywords: Monodon baculovirus, MBV, *Penaeus monodon*

บทนำ

จากการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งสามารถสร้างรายได้เข้าสู่ประเทศไทยปีละหลายหมื่นล้านบาทติดต่อกันเป็นระยะเวลามากกว่า 15 ปี โดยประเทศไทยสามารถก้าวขึ้นมาเป็นผู้ส่งออกกุ้งอันดับหนึ่งของโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 ติดต่อกันจนถึงปัจจุบัน อุตสาหกรรมกุ้งได้สร้างรายได้เข้าประเทศแล้วเป็นรายได้สุทธิถึงประมาณ 1 ล้านล้านบาท ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540-2554 (สมศักดิ์, 2554) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) มีถิ่นกำเนิดในมหาสมุทรอินเดีย ทะเลจีนใต้ และมหาสมุทรแปซิฟิก ถูกนำมาเลี้ยงกันมากในทวีปเอเชียและทวีปออสเตรเลีย ในประเทศไทยพบการแพร่กระจายทั่วไปในอ่าวไทย พบมากบริเวณเกาะช้าง บริเวณนอกฝั่งชุมพรถึงนครศรีธรรมราช ทางฝั่งอันดามันพบมากที่จังหวัดภูเก็ตและจังหวัดระนอง อาศัยอยู่บริเวณน้ำลึกห่างจากฝั่งและชอบพื้นที่เป็นดินทราย สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำได้ เช่น ป่าชายเลน กุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทนทาน เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี จึงนิยมเพาะเลี้ยงเพื่อการค้าโดยมีผลผลิตเกือบทั้งหมดเพื่อการส่งออก ประเทศไทยจึงเป็นผู้นำด้านการผลิตและ

ส่งออกกุ้งกุลาดำติดต่อกันมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 ต่อมาเกิดปัญหากุ้งติดเชื้อและกุ้งโตช้าทำให้ผลผลิตลดลงไม่สามารถที่จะรักษาระดับการผลิตให้คงที่ได้อย่างต่อเนื่อง (ชลอ, 2543) ตั้งแต่กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ อนุญาตให้มีการนำพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาว แวนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ปลอดเชื้อเข้ามาทดลองเลี้ยงในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2545 จนถึงสิ้นเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2546 ปรากฏว่าเกษตรกรที่เลี้ยงกุ้งชนิดนี้ส่วนใหญ่ประสบความสำเร็จมากกว่าที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำ (ชลอ, 2543) และตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 เป็นต้นมา ประเทศไทยได้ปรับเปลี่ยนจากอุตสาหกรรมการผลิตกุ้งกุลาดำมาเป็นผลิตกุ้งขาว เนื่องจากการผลิตกุ้งขาวทำได้ง่ายและให้ผลผลิตมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบพื้นที่การผลิตเท่ากัน เนื่องจากกุ้งขาวสามารถอยู่ในน้ำได้ทุกระดับของบ่อ และอีกเหตุผลหนึ่งเนื่องมาจากการพัฒนาสายพันธุ์ของกุ้งขาวที่ได้รับการพัฒนามาแล้วกว่า 20 ปี (Flegel, 2006) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันภาครัฐได้มีการส่งเสริมให้พัฒนาสายพันธุ์กุ้งกุลาดำซึ่งเป็นกุ้งพื้นเมืองของไทยอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ปลอดโรคและโตเร็ว กุ้งกุลาดำมีข้อดีคือมีขนาดใหญ่กว่ากุ้งขาวที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 4-5 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่จับขายได้ มีสีแดงจัดเมื่อต้มสุกโดยไม่จำเป็นต้องให้อาหารเสริมเพื่อเร่งสี และมีผลกำไรต่อกิโลกรัมมากกว่ากุ้งขาว ประกอบกับปัจจุบันการผลิตกุ้งขาวเริ่มประสบปัญหาราคาตกต่ำ เนื่องจากผลผลิตที่มีปริมาณมาก รวมทั้งปัญหาการเกิดโรค จึงมีแนวโน้มว่าการเลี้ยงกุ้งกุลาดำจะกลับคืนมาอีกครั้ง เพื่อเป็นการช่วยส่งเสริมอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ การช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ด้วยงานวิจัยนับว่าเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อการเพาะเลี้ยงที่ยั่งยืน

โรคโมโนดอนแบคคิวโลไวรัส (Monodon baculovirus; MBV)

โรคที่พบบ่อยและก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตกุ้งกุลาดำ ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคแคระแกร็น (infectious hypodermal and hematopoeitic necrosis virus; IHHNV) ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในทางเดินอาหาร (hepatopancreatic pavovirus; HPV) ทอร่าซินโดรมไวรัส (taura syndrome virus; TSV) และโมโนดอนแบคคิวโลไวรัส (monodon baculovirus; MBV) (Lightner and Redman, 1998) ซึ่งโรคติดเชื้อโมโนดอนแบคคิวโลไวรัสในกุ้งกุลาดำเป็นโรคที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยและในหลายภูมิภาคทั่วโลก เกิดจากไวรัส *Penaeus monodon* types Baculovirus หรือเอ็มบีวี (MBV) ซึ่งเป็นไวรัสที่มีขนาด 75×300 นาโนเมตร มีสายพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ มี envelope รูปร่างแท่ง เพิ่มจำนวนในนิวเคลียสของเซลล์ จัดอยู่ในครอบครัว *Baculoviridae* (Theilmann and Blissard, 2008)

ในเอเชีย พบไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2524 จากลูกกุ้งกุลาดำในประเทศไต้หวัน (Lightner and Redman, 1981) หลังจากนั้นมีการรายงานการระบาดหลายประเทศทั่วโลกและพบในกุ้งทะเลหลายชนิด ประเทศไทยได้ตรวจพบเชื้อไวรัส MBV ในลูกกุ้งกุลาดำครั้งแรกในปี พ.ศ. 2534 ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อภาคอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งอย่างมาก เนื่องจากกุ้งที่ติดเชื้อ MBV จะไม่ใช่สาเหตุทำให้กุ้งตาย จึงไม่ได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำมากนัก แต่การที่กุ้งติดเชื้อจะทำให้กุ้งมีความยาวลำตัวลดลงและกุ้งโตช้ากว่ากุ้งปกติ (Flegel et al., 2004) จึงต้องเพิ่ม

ระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้นเพื่อให้ได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการ ส่งผลให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายของเกษตรกร อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อ MBV เป็นสาเหตุหลักทำให้ลูกกุ้งกุลาดำระยะลาร์วา (larva) โพสท์ลาร์-วา post larva และจูวีไนล์ (juvenile) เกิดอัตราการตายถึง 90% เนื่องจากเชื้อจะเข้าอยู่ไปในเซลล์ตับและตับอ่อนโดยไม่แสดงอาการป่วยให้เห็นจนกว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมหรือมีการเลี้ยงที่หนาแน่นเกินไป ทำให้กุ้งเกิดความเครียด ร่างกายอ่อนแอลง จึงพบการแสดงอาการของโรค คือ เซลล์ตับและตับอ่อนถูกทำลายหลังจากนั้นแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำเข้าสู่ร่างกายกุ้งทำให้เกิดความเสียหาย (Lightner et al., 1983) ทำให้เชื้อ MBV เป็นปัญหากับระบบโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก

การป้องกันโรค MBV ในปัจจุบันทำโดยการล้างไข่กุ้งและนอเพลียส (nauplius) ด้วยน้ำทะเลสะอาดที่ไหลผ่านเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจุ่มไข่กุ้งและนอเพลียสลงในน้ำผสมฟอร์มาลินที่ความเข้มข้น 300 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยการจุ่มไข่กุ้งและนอเพลียสลงในน้ำผสมไอโอดีนที่ความเข้มข้น 50-200 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างต่อในน้ำทะเลที่สะอาดอย่างน้อย 3 นาที แล้วจึงย้ายลงไปเลี้ยงในถังเพาะฟัก วิธีปฏิบัติเช่นนี้ได้ทำในทุกโรงเพาะฟัก นอกจากการป้องกันการติดเชื้อโดยการล้างฆ่าเชื้อไข่และนอเพลียสแล้ว การติดตามการติดเชื้อในโรงเพาะฟักก็เป็นสิ่งจำเป็นที่ควรปฏิบัติก่อนการย้ายลูกกุ้งเลี้ยงในบ่อ

การตรวจวินิจฉัยโรคเอ็มบีวี (MBV)

ปัจจุบันการตรวจจับเชื้อในโรงเพาะฟักมีด้วยกัน 2 วิธีหลัก คือ การตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาและการตรวจทางชีวโมเลกุล

1. วิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา (histological methods)

เชื้อ MBV สามารถตรวจหาได้ด้วยการทำสวอช เมานท์ (squash mount) เซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งในระยะโพสต์ลาร์วา (post larva; PL) เพื่อตรวจหา ก้อนโปรตีน (inclusion body) บางครั้งอาจเรียกว่า occlusion body ซึ่งเป็นถุงโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคไวรัสหลาย ๆ อนุภาคไว้ ถุงโปรตีนนี้จะประกอบด้วยโปรตีนหลัก คือ พอลิไฮดริน (polyhedrin) การตรวจวินิจฉัยโรคทำโดยการตรวจหาถุง inclusion body ภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับและตับอ่อน โดยนำตับและตับอ่อนกุ้งมาบดบนแผ่นสไลด์และหยดสารละลายมาลาไคต์กรีน (malachite green) ความเข้มข้น 0.1% หรือ 5% แล้วนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะสังเกตพบ inclusion body อยู่ในนิวเคลียสซึ่งจะติดสีเขียว โดยดูเปรียบเทียบกับถุงไขมันที่ย้อมไม่ติดสี (รูปที่ 1) เมื่อเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งถูกทำลาย inclusion body จะถูกขับออกมากับขี้กุ้งและถูกกินโดย larva ตัวอื่น ๆ ในบ่อเดียวกันทำให้เกิดการติดเชื้อไปยังลูกกุ้งแบบฮอริซอนทอลทรานสมิสชัน (horizontal transmission) ในกรณีที่เป็นกุ้งโตเต็มวัยหรือเป็นพ่อแม่พันธุ์ อาจนำขี้กุ้งจากบ่อเลี้ยงมาตรวจด้วยวิธีดังกล่าว ทำให้สามารถวินิจฉัยโรคได้โดยไม่ต้องใช้เนื้อเยื่อกุ้ง

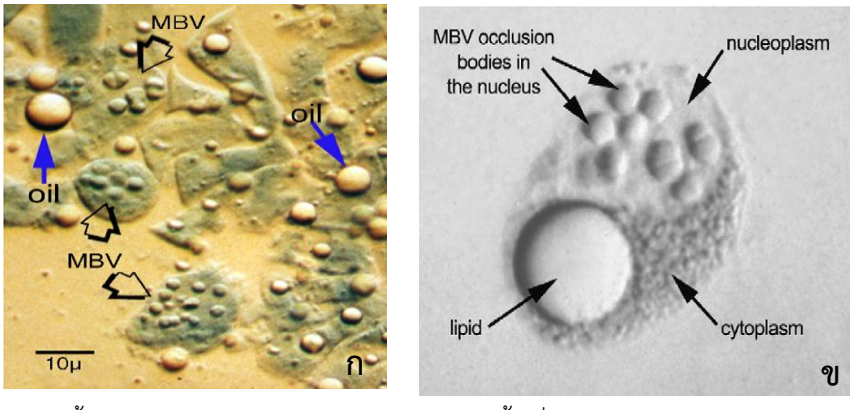
นอกจากนี้ยังสามารถตรวจ inclusion body ได้โดยตรงจากเนื้อเยื่อกุ้งที่เริ่มเข้าสู่ระยะ PL โดยส่องไฟผ่านชั้นคิวติเคิล (cuticle) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 40 เท่า (40x) (รูปที่ 2ก) หากนำเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งระยะ PL ตรึงบนแผ่นสไลด์ย้อมด้วยฮีมาโตไซลิน (hematoxylin) และอิโอซิน (eosin) (H&E) ในระยะแรกของการติดเชื้อ (early stage) จะพบนิวเคลียสมีการบวมใหญ่ขึ้นและเกิดการอัดแน่นของสายโครมาติน (chromation) (รูปที่ 2ข)

แต่เมื่อการติดเชื้อเข้าสู่ระยะสุดท้าย (late stage) ภายในนิวเคลียสจะมีก้อนโปรตีน inclusion body (occlusion body) เกิดขึ้น เมื่อเข้าสู่ระยะสุดท้ายของการติดเชื้อเซลล์จะตายและสลาย inclusion body จะถูกกำจัดออกทางท่อตับและตับอ่อนผสมออกมากับอุจจาระทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อได้ (รูปที่ 2 ข) วิธีการตรวจหา inclusion body ด้วยการย้อม H&E ทำได้โดยหยดสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้น 2.8% ที่มีส่วนผสมของฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% ลงบนสไลด์ตามด้วยการบดเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนจากบ่อกุ้งลงแผ่นสไลด์ รอให้แห้งแล้วย้อมด้วย H&E นำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบ inclusion body หรือจะดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) หากในสารละลายอิโอซินมีส่วนผสมของสีฟลอซีน (phloxine) (รูปที่ 3)

2. วิธีทางชีวโมเลกุล (Molecular methods)

2.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสระดับดีเอ็นเอ

การตรวจเชื้อไวรัส MBV ในกุ้งด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) เกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศออสเตรเลีย (Vickers et al., 1992) งานวิจัยดังกล่าวไม่ได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจไวรัส ต่อมานักวิจัยกลุ่มประเทศไต้หวันตรวจเชื้อ MBV ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ยีนพอลิไฮดริลของแมลง (insect polyhedrin) ให้ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ขนาด 600 คู่เบส (Chang et al., 1993; Lu et al., 1993) นำไปออกแบบเป็นโพรบ (probe) ใช้ในการทำ dot blot hybridization และ *in situ* hybridization เพื่อตรวจเชื้อ MBV ในเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำแต่พบว่าไพรเมอร์ (primer) ที่ออกแบบมาไม่สามารถใช้ตรวจเชื้อ MBV สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทย ออสเตรเลีย และอินเดียได้ (Belcher, 1998; Satidkanitkul et al., 2005; Flegel, 2006) ทั้งนี้เนื่องจากความหลากหลายของสายพันธุ์ไวรัสที่ระบาดในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกัน จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค nested PCR ซึ่งเป็นปฏิกิริยา PCR 2 ขั้นตอนอาศัยไพรเมอร์ 2 คู่ ไพรเมอร์คู่แรกจะขยายส่วน DNA ที่มีขนาดใหญ่และอยู่นอก DNA เป้าหมาย นำผลผลิตจาก PCR จากขั้นตอนแรกเป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 เพื่อเพิ่มขยาย DNA เป้าหมายทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดสั้นกว่าผลผลิต PCR ในขั้นตอนแรก ซึ่ง nested PCR ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจจับ MBV ที่ระบาดในประเทศไทยและออสเตรเลียได้อย่างจำเพาะเจาะจง เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจถูกออกแบบจากชิ้นส่วน DNA ของไวรัส MBV เอง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งให้ผลผลิต PCR จากปฏิกิริยา PCR และ nested PCR ขนาดเท่ากับ 533 และ 361 คู่เบส ตามลำดับ วิธีนี้มีความแม่นยำสูงในการตรวจที่ระดับ DNA ของเชื้อ MBV เท่ากับ 0.01 เฟมโตกรัม (fg) (รูปที่ 4ข) (Belcher and Young, 1998) การตรวจเชื้อ MBV ด้วยวิธี PCR แบบขั้นตอนเดียว สามารถตรวจพบการติดเชื้อ MBV ที่ระดับ DNA ของไวรัสเท่ากับ 10 พิโคกรัม (pg) เท่านั้น (รูปที่ 4ก) หากมีการติดเชื้อในปริมาณที่ต่ำกว่าระดับดังกล่าว จำเป็นต้องตรวจการติดเชื้อด้วย nested PCR ร่วมด้วยซึ่ง จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจเชื้อ MBV ในกุ้งนอกจากนี้ Belcher and Young (1998) นำอุจจาระกุ้งมาตรวจการติดเชื้อ MBV ด้วยวิธี dot blot DNA hybridization และ PCR โดยใช้โพรบและไพรเมอร์ดังกล่าวได้สำเร็จเป็นครั้งแรก ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อ MBV ในพ่อแม่พันธุ์และกุ้งในบ่อกุ้งที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อได้โดยไม่จำเป็นต้องนำเนื้อเยื่อกุ้งมาตรวจวิเคราะห์

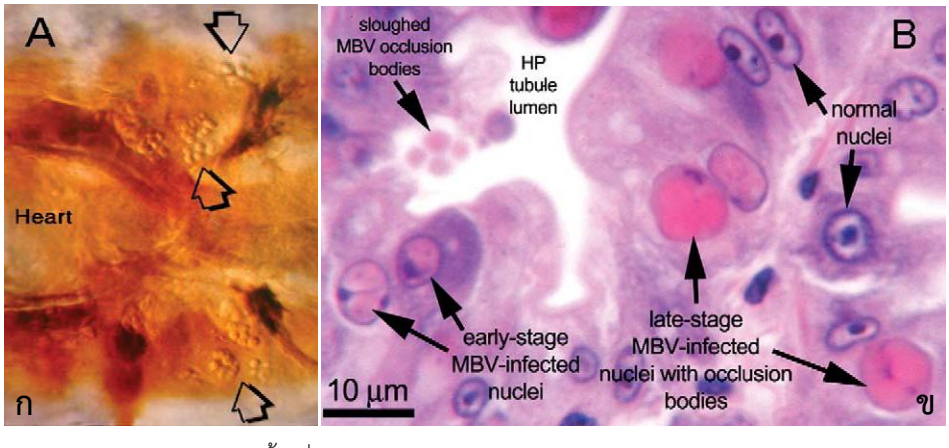


รูปที่ 1 การตรวจเชื้อ MBV ด้วยการทำ squash mouth ของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำระยะ PL

ก. นิวเคลียสติดสีเขียวของมาลาไคต์กรีนพบ inclusion body อยู่ในนิวเคลียสทำให้นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนเม็ดไขมันจะไม่ติดสี

ข. เซลล์ตับและตับอ่อนมีก้อนโปรตีนอยู่ในนิวเคลียสและเม็ดไขมันในไซโตพลาสซึม

ที่มา: Flegel (2006)

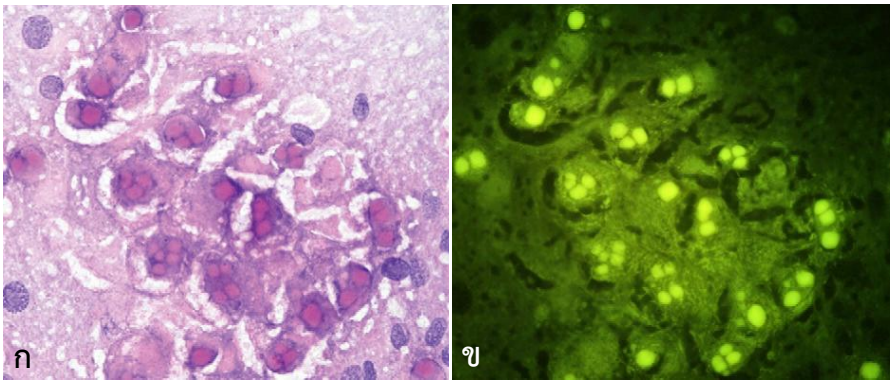


รูปที่ 2 ถุง inclusion body ในเนื้อเยื่อกุ้ง

ก. inclusion body ในเนื้อเยื่อกุ้งระยะ PL ส่องผ่านชั้นคิวติเคิลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลัง ขยาย 40 เท่า

ข. เนื้อเยื่อกุ้งย้อม H&E แสดงการติดเชื้อระยะ early stage, late stage และ inclusion body จำนวน 4 ก้อนถูกขับออกทางท่อของตับและตับอ่อน

ที่มา: Flegel (2006)



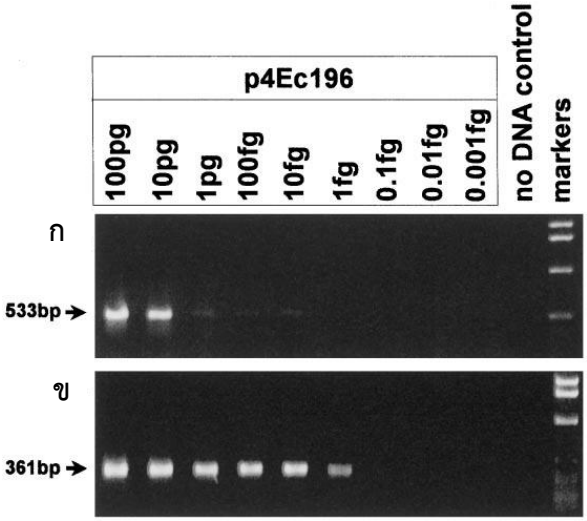
รูปที่ 3 ก้อน inclusion body ในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนจากกุ้งวัยอ่อน (juvenile shrimp) ส่องดูภายใต้กล้อง-จุลทรรศน์แบบธรรมดา (ก) และกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (ข)

ที่มา: Flegel (2006)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อ MBV ด้วยปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยา	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm (°C)
PCR	MBV 1.4F	5′-CGA TTC CAT ATC GGC CGA ATA-3′	62
	MBV 1.4R	5′-TTG GCA TGC ACT CCC TGA GAT-3′	64
nested PCR	MBV 1.4NF	5′-TCC AAT CGC GTC TGC GAT-3′	65
	MBV 1.4NR	5′-CGC TAA TGG GGC ACA AGT CTC-3′	66

ที่มา: Belcher and Young (1998)



รูปที่ 4 การตรวจเชื้อ MBV ด้วยวิธี PCR โดยใช้ p4Ec196 เป็น DNA แม่พิมพ์ในการทำปฏิกิริยา PCR ที่มีการเจือจาง DNA แม่พิมพ์ลง 10 เท่า เท่ากับ 100 พิโคกรัม ถึง 0.001 เฟมโตกรัม โดยวิธี PCR (ก) และ nested PCR (ข)

ที่มา: Belcher and Young (1998)

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างที่มีการตรวจพบเชื้อไวรัส WSSV IHHNV และ MBV ด้วย TaqMan® real time และ fast short-fragment PCR จากจำนวนตัวอย่างชนิดละ 24 ตัวอย่าง

เชื้อไวรัส	TaqMan®	Fast PCR
WSSV69	17	24
WSSV154	2	19
IHHNV81	0	21
IHHNV77	13	18
MBV135	0	0
ทั้งหมด	**32**	**82**

ที่มา: Mrotzek et al. (2010)

จากปัญหาความหลากหลายของสายพันธุ์ไวรัสทำให้มีการพัฒนาไพรเมอร์ที่สามารถตรวจ MBV ที่จำเพาะกับไวรัสที่ระบาดในแหล่งเลี้ยงกุ้ง 4 แหล่ง คือ ฮาวาย ไทย ไต้หวัน และมาเลเซีย ซึ่งมีความจำเพาะและสามารถตรวจไวรัสในแหล่งดังกล่าวที่ระดับ DNA ไวรัส 100 ชุด (copy) (Surachetpong et al., 2005) นอกจากวิธี PCR แล้ว ยังมีการใช้เทคนิค real-time PCR เพื่อตรวจเชื้อ MBV ในเนื้อเยื่อกุ้งไทยและอินโดนีเซีย (Yan et al., 2009) และยังสามารถตรวจ DNA ไวรัส จำนวน 1 copy ซึ่งมีความไวในการตรวจจับมากกว่า PCR แต่มีข้อจำกัด คือต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง ซึ่งเป็นปัญหาต่อการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปหรือระบบฟาร์ม จึงได้พัฒนาเทคนิค fast short-fragment PCR (Mrotzek et al., 2010) ซึ่งเป็น PCR ที่มีการประยุกต์ใช้วิธีการทำปฏิกิริยาให้รวดเร็วขึ้นโดยปรับลดปริมาตรของปฏิกิริยารวมทั้งขั้นตอนของอุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยาให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเดียวกัน และใช้สารย้อมวุ้นที่มีความไวมากขึ้น คือใช้ปริมาตรของปฏิกิริยา 5-10 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ การทำให้ดีเอ็นเอแม่พิมพ์เสียสภาพ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที ตามด้วยการทำให้ไพรเมอร์เข้าเกาะบริเวณจำเพาะในสายดีเอ็นเอ (annealing) และ เพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 40 รอบ ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา PCR เพียง 25-30 นาที วิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาด 70-150 คู่เบส ด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (gel elctrophoresis) เป็นเวลา 10 นาที ย้อมสีวุ้นด้วยเจลสตาร์ (GelStar) ซึ่งเป็นสารสีย้อมที่มีความไวในการตรวจจับมากกว่าสีย้อมชนิดอื่นๆ รวมเวลาในการตรวจสอบทั้งหมดประมาณ 1 ชั่วโมง ซึ่งมีความแม่นยำและรวดเร็วกว่าการใช้ TaqMan real-time PCR ดังแสดงในตารางที่ 2

เทคนิคที่กล่าวมา เช่น Histopathology, PCR, nested PCR มีข้อด้อยในการตรวจไวรัส คือ มีความไวต่ำ ใช้เวลานาน ใช้สารเคมีบางชนิดที่เป็นพิษ ไม่เหมาะในการปฏิบัติงานภาคสนาม ต่อมา Nimitphak et al. (2010) ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสให้รวดเร็วและง่าย โดยใช้เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับ lateral-flow dipstick (LFD) เรียกว่า LAMP-LFD ตรวจเชื้อได้ภายในเวลา 75 นาที (ไม่รวมเวลาในการสกัด DNA) วิธีนี้มีความแม่นยำในการตรวจ DNA เชื้อไวรัส เท่ากับ 0.1 พิโคกรัม ซึ่งไวกว่าการตรวจด้วย PCR ร่วมกับ nested PCR (มีความไวในการตรวจ 1

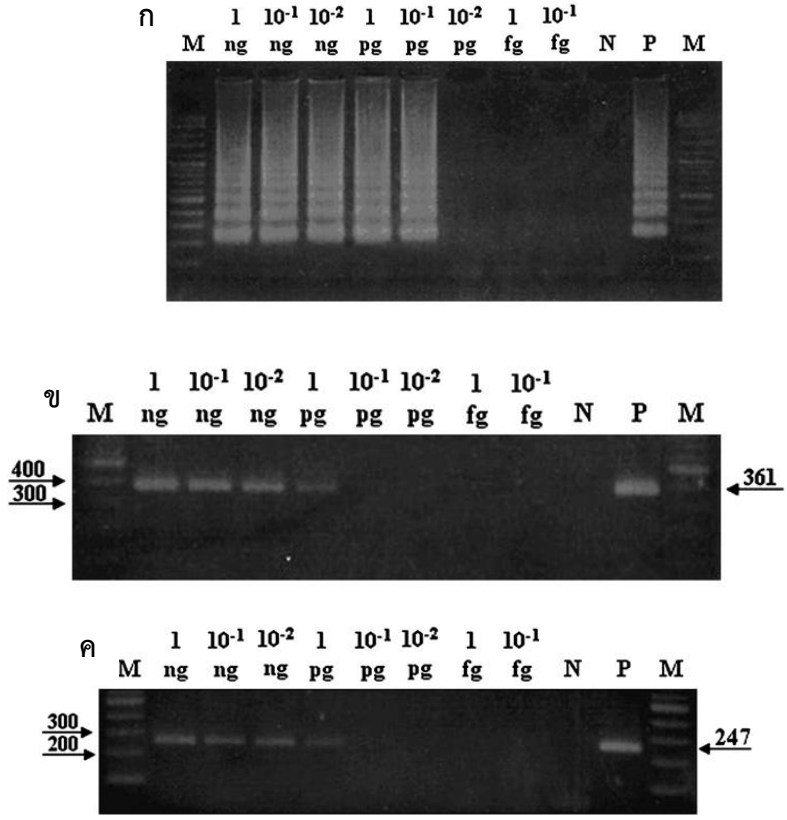
พิโคกรัม) (Belcher and Young, 1998) LAMP เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่น (Notomi et al., 2000) หลักการคือ การเพิ่มขยายยีนจำเพาะโดยต้องใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จะจำเพาะกับยีนถึง 6 ตำแหน่ง การเพิ่มขยายยีนจะใช้อุณหภูมิคงที่และใช้คุณสมบัติ strand displacement ของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยา วิธีนี้มีความจำเพาะสูงและราคาไม่แพง เนื่องจากต้องการเครื่องมือง่าย ๆ ในการควบคุมอุณหภูมิที่ 60-65 องศาเซลเซียส แทนการใช้เครื่อง PCR เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยแผ่นเมมเบรน chromatographic lateral-flow dipsticks (LFD) โดยใช้หลักการ hybridization ระหว่าง DNA เป้าหมายกับโพรบที่มีการติดฉลาก ซึ่งในขั้นตอนนี้จะใช้เวลาตรวจจับเพียง 10-15 นาที และจะพบแถบสีที่ระบุว่ามีการติดเชื้อบนแผ่นเมมเบรน วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนในการทำปฏิกิริยาแต่มีความไวสูง และวิธีการตรวจผลด้วยแผ่นเมมเบรนจะรวดเร็วกว่าการตรวจผลด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส (รูปที่ 5) LAMP-LFD ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสหลายชนิด เช่น Taura syndrome virus (TSV), *Penaeus monodon* densovirus (*Pm*DNV) และ infectious myonecrosis virus (IMNV) (Kiatpathomchai et al., 2008; Nimitphak et al., 2008; Puthawibool et al., 2009)

2.2 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสระดับโปรตีน

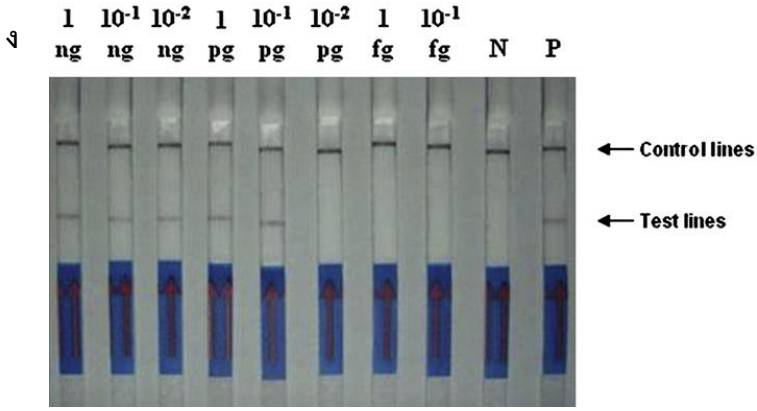
การตรวจจับเชื้อในระดับ DNA ด้วย PCR เป็นวิธีที่เหมาะในการตรวจเชื้อ MBV ในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ไม่เหมาะในการปฏิบัติงานฟาร์มสำหรับเกษตรกร จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโดยใช้หลักการโมโนโคลนอลแอนติบอดี้ (monoclonal antibody) ขึ้น แม้ว่าวิธีนี้จะมีความแม่นยำน้อยกว่า PCR แต่เป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ราคาไม่แพง และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาให้วิธีการดังกล่าวมีความสะดวกและแม่นยำในการใช้งานมากขึ้นโดยพัฒนาระบบการตรวจแบบแผ่นตรวจจับ (strip test) ซึ่งเหมาะในการใช้งานในระดับฟาร์ม (Sithigorngul et al., 2011) การพัฒนาการตรวจเชื้อไวรัส MBV ด้วยระบบ monoclonal antibody จำเป็นต้องทำบริสุทธิ์โปรตีนของไวรัสเพื่อนำมาผลิต antibody ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส MBV โดย Satidkanitkul et al. (2005) ได้ประสบความสำเร็จในการทำบริสุทธิ์โปรตีนพอลิไฮดรินจากเชื้อไวรัส MBV และหาลำดับของกรดแอมิโนจากด้านปลายไนโตรเจน (N-terminal) จำนวน 25 ชนิด นำมาสังเคราะห์และผลิตเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดี้ (polyclonal antibody) ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนพอลิไฮดรินของเชื้อ แต่ polyclonal antibody ที่ผลิตได้มีความไวและความจำเพาะต่ำ ต่อมา Boonsanongchokying et al. (2006) ได้สกัดโปรตีนพอลิไฮดรินจากเนื้อเยื่อตับกุ้งที่เป็นโรค นำมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุล ให้ค่าน้ำหนักเท่ากับ 58 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 6ก) และนำโปรตีนดังกล่าวมาผลิต monoclonal antibody ได้ 7 ชนิด (รูปที่ 6ข) เมื่อนำ antibody ดังกล่าวมาทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่ามีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อ MBV และไม่ทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น HPV, YHV และ WSSV

ต่อมาได้มีการโคลนยีนพอลิไฮดรินของ MBV หาลำดับยีนและผลิตเป็นรีคอมบิแนนต์โปรตีนพอลิไฮ-ดรินทางด้าน N-terminal (OB-N) และ C-terminal (OB-C) พบว่า โปรตีนทั้ง 2 ส่วนมีความจำเพาะต่อ monoclonal antibody ที่ผลิตได้ ในงานวิจัยก่อน

หน้านี้ (ตารางที่ 3) (Chaivisuthangkura et al., 2008) ได้นำโปรตีนทั้งสองส่วนมาผลิต monoclonal antibody และทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี dot blotting และ western blotting พบว่า สามารถตรวจจับเชื้อ MBV ได้และไม่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสชนิด TSV, YHV, WSSV และ *Pm*DNV เมื่อเปรียบเทียบกับ PCR พบว่า มีความไวน้อยกว่า PCR 100 เท่า (Sridulyakul et al., 2011) จากผลงานวิจัยดังกล่าวทำให้ทีมวิจัยของ Wangman et al. (2012) ได้พัฒนาแผ่นตรวจอิมมูโนโครมาโตกราฟฟิค (immunochromatographic strip test) เพื่อใช้ตรวจสอบเชื้อ MBV ในระดับฟาร์มได้โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างง่าย ๆ คือ บดเนื้อเยื่อกุ้งด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline, PBS) ให้ความร้อนเป็นเวลา 15-60 นาที นำไปตรวจเชื้อด้วยแผ่น strip test รอเวลา 15 นาที จะทราบผลการตรวจ (รูปที่ 7) ซึ่งมีความไวน้อยกว่า PCR ปกติ 200 เท่า ถึงแม้ว่าความไวจะต่ำ แต่วิธีการตรวจสอบเชื้อทำได้ง่ายและรวดเร็ว ซึ่งเหมาะในการนำไปใช้ตรวจเชื้อในโรงเพาะฟักและฟาร์มได้



รูปที่ 5 เจลอิเลคโตรโฟรีซิส และ LAMP-LFD แสดงความไวในการตรวจไวรัส MBV ในกุ้งระยะ PL เมื่อใช้ DNA แม่พิมพ์ ที่ระดับ 1 นาโนกรัม ถึง 0.1 เฟมโตกรัม



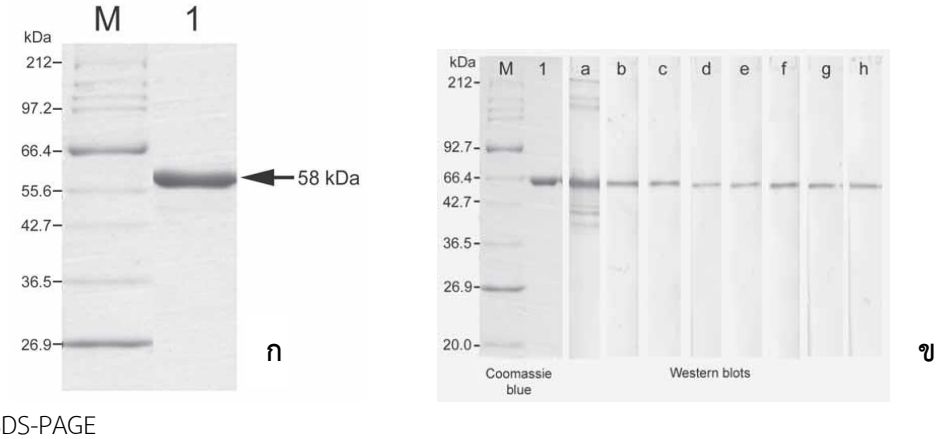
รูปที่ 5 เจลอิเลคโตรโฟรีซิส และ LAMP-LFD แสดงความไวในการตรวจไวรัส MBV ในกุ้งระยะ PL เมื่อใช้ DNA แม่พิมพ์ ที่ระดับ 1 นาโนกรัม ถึง 0.1 เฟมโตกรัม (ต่อ)

ก. LAMP ข. Nested PCR (commercial kit, Ezee Gene)

ค. One step PCR (Nimitphak et al., 2010) ง. LAMP-LFD

หมายเหตุ: M คือ DNA มาตรฐาน (DNA marker), N คือ ปฏิกิริยาที่ไม่มีการเติม DNA แม่พิมพ์ (negative control), P คือ ปฏิกิริยาที่มี DNA plasmid เป็นชุดควบคุม (positive control)

ที่มา: Nimitphak et al. (2010)



รูปที่ 6 SDS-PAGE

ก. น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนพอลีไฮดริน ที่สกัดได้จากไวรัส MBV

ข. Western blot polyhedrin เมื่อทำปฏิกิริยากับ MBV polyclonal antibody (a) และmonoclonal antibody จำนวน 7 ชนิด (b-h)

ที่มา: Boonsanongchokying et al. (2006)

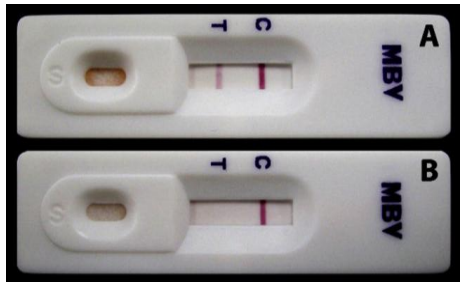
ตารางที่ 3 การทดสอบความจำเพาะของ monoclonal antibody ชนิดต่าง ๆ ต่อรีคอมบิแนนต์ MBV polyhedrin ด้วย Western blotting (Chaivisuthangkura et al., 2008)

MAb	Purified OB protein	OB-N recombinant protein	OB-C recombinant protein
MBV21-4B	+++	+++	–
MBV25-4G	+++	+++	–
MBV6-9G	+++	+++	–
MBV14-1G	+++	+++	–
MBV16-3G	+++	+++	–
MBV21-11B	+++	+++	–
MBV24-5E	+++	+++	–
MBV5-3H	++++	–	+
MBV10-11H	+++	–	+++
MBV21-8A	+++	–	+++
MBV5-6F	+++	–	+++
MBV8-5G	+++	–	+++

Immunoreactivity was arbitrarily scored: ++++ = very strong; +++ = strong; + = light; and – = negative result.

ก

ข



รูปที่ 7 ผลการตรวจการติดเชื้อ MBV ในกุ้งด้วย MBV strip test

ก. โปรตีนสกัดของกุ้งติดเชื้อ

ข. โปรตีนสกัดของกุ้งไม่ติดเชื้อ

ที่มา: Wangman et al. (2012)

สรุป

แม้ว่าเชื้อ MBV จะไม่ก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเมื่อเปรียบเทียบกับ YHV หรือ WSSV แต่หากกุ้งในระยะวัยอ่อนติดเชื้อ MBV จะทำให้เกิดการตายในอัตราการที่สูง ส่งผลกระทบต่อโรงเพาะฟักในการผลิตลูกกุ้งให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการและปลอดจากเชื้อ MBV เนื่องจาก หากนำกุ้งที่ติดเชื้อลงเลี้ยงในบ่อ กุ้งจะโตช้ากว่ากุ้งปลอดเชื้อจึงต้องเพิ่มระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น การเฝ้าระวังการติดเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อระบบโรงเพาะฟัก เทคนิคที่ได้กล่าวมา การพัฒนาการตรวจเชื้อในระดับเนื้อเยื่อจนถึงระดับ DNA และโปรตีนจนสามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ ซึ่งชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นแม้จะมีความแม่นยำในการตรวจจับน้อยกว่าการตรวจในระดับดีเอ็นเอ แต่การตรวจด้วยชุดตรวจสอบมีวิธีการใช้ง่าย ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง เกษตรกรสามารถตรวจหาเชื้อได้ด้วยตัวเอง ซึ่งนำไปสู่การป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์ และ ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที สำหรับคำแนะนำในการเขียนและตรวจทานแก้ไขบทความวิจัยฉบับนี้

เอกสารอ้างอิง

สมศักดิ์ ปณีตัธยาศัย. (2554). อุตสาหกรรมกุ้งไทยปี 2554 และแนวโน้ม. สมาคมกุ้งไทย. แหล่งข้อมูล: http://www.thaichamber.org/userfiles/file/7(1).pdf. ค้นเมื่อ วันที่ 14 กันยายน 2555.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2543) กุ้งไทย 2000. กรุงเทพ: เจริญรัตน์การพิมพ์. 259 หน้า.

Belcher, C. R. (1998). Molecular detection and characterization of monodon baculovirus. Thesis. University of Queensland, Brisbane.

Belcher, C. R. and Young, P. R. (1998). Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. Journal of Virological Methods 74: 21-29.

Boonsanongchokying, C., Sang-oum, W., Sithigorngul, P., Sriurairatana, S., and Flegel, T. W. (2006). Production of monoclonal antibodies to polyhedrin of monodon baculovirus (MBV) from shrimp. ScienceAsia 32: 371-376.

Chang, P. S., Lo, C. F., Kou, G. H., Lu, C. C., and Chen, S. N. (1993). Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). Journal of Invertebrate Pathology 62: 116-120.

Chaivisuthangkura, P., Tawilert, C., Tejangkura, T., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Sithi gorngul, W., and Sithigorngul, P. (2008). Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. Virology 381: 261-267.

Flegel, T. W., Nielsen, L., Thamavit, V., Kongtim, S., and Pasharawipas, T. (2004). Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. Aquaculture 240: 55-68.

Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture (258): 1-33.

Kiatpathomchai, W., Jaroenram, W., Arunrut, N., Jitrapakdee, S., and Flegel, T. W. (2008). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with the lateral flow dipstick test for specific detection of the Taura syndrome virus. Journal of Virological Methods 153: 214-217.

Lightner, D.V. and Redman, R.M. (1981). A baculovirus-caused disease of penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. Journal of Invertebrate Pathology 38: 299-302.

Lightner, D.V. and Redman, R.M. (1998). Shrimp disease and current diagnostic methods. Aquaculture. 164 (1-4): 201-220.

Lightner, D. V., Redman, R. M and Bell, T. A. (1983). Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* fabricius. Aquaculture 32: 209-33.

Lu, C. C., Tang, K. F. J., Kou, G. H. and Chen, S. N. (1993). Development of a *Penaeus monodon* type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. Journal of Fish Diseases 16: 551-559.

Mrotzek, G., Haryanti, Koesharyani, I., and Tretyakov, A. N., Sugama, K., and Saluz, H. P. (2010). Fast short-fragment PCR for rapid and sensitive detection of shrimp viruses. Journal of Virological Methods 168: 262-266.

Nimitphak, T., Kiatpathomchai, W., and 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.

Nimitphak, T., Meemetta, W., Arunrut, N., Senapin, S., and Kiatpathomchai, W. (2010). Rapid and sensitive detection of *Penaeus monodon* nucleopolyhedro virus (PemoNPV) by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. Molecular and Cellular Probes 24: 1-5.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28 (12): e63.

Puthawibool, T., Senapin, S., Kiatpathomchai, W., and Flegel, T. W. (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.

Satidkanitkul, A., Sithigorngul, P., Sang-oum, W., Rukpratanporn, S., Sriurairatana, S., Withyachumnankul, B., and Flegel, T.W. (2005). Synthetic peptide used to develope antibodies for detection of polyhedrin from *P. monodon* baculo virus (MBV). Diseases of Aquatic Organisms 65: 79-84.

Sithigorngul, P., Rukpratanporn, R., Chaivisuthang kura, P., Sridulyakul, P., and Longyant, S. (2011). Simultaneous and rapid detection of white spot syndrome virus and yellow head virus infection in shrimp with a dual immunochromatographic strip test. Journal of Virological Methods 173: 85–91.

Sridulyakul, P., Suwannaka, T., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Rukpratanporn, S., and Sithigorngul, P. (2011). *Penaeus mono- don* nucleopolyhedrovirus detection using monoclonal antibodies specific to recombinant polyhedrin protein. Aquaculture 321: 216-222.

Surachetpong, W., Poulos, B.T., Tang, K.F.J., and Lightner, D.V. (2005). Improvement of PCR method for detection of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. Aquaculture 249: 69-75.

Theilmann, D. A. and Blissard, G. W. (2008). Baculoviruses: molecular biology of nucleopolyhedroviruses. In: Encyclope- dia of Virology 254-265.

Vickers, J. E., Lester, R. J. G., Spradbrow, P. B., and Pemberton, J. M. (1992). Detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) in digestive glands of postlarval prawns using polymerase chain reaction. *In* Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture, vol. I. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 127-133.

Wangman, P., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., and Sridulkakul, P. (2012). *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus detection using an immunochromatographic strip test. Journal of Virological Methods 183: 210-214.

Yan, D., Tang, K.F.J., and Lightner, D.V. (2009). Development of a real-time PCR assay for detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. Journal of Invertebrate Pathology 102: 97-100.

❑❑❑❑❑