การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลากะพงขาวและพาหะนำโรค

อรอนงค์ เจริญไวย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางทะเล
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลากะพงขาวและพาหะนำโรค

อรอนงค์ เจริญไวย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางทะเล
คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

Detection of scale drop disease virus (SDDV) from non-lethal samples of Asian seabass (*Lates calcarifer*) and its potential carriers

มหาวิทยาลัยบูรพา
BURAPHA UNIVERSITY

ONANONG CHAROENWAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE
IN MARINE TECHNOLOGY
FACULTY OF MARINE TECHNOLOGY
BURAPHA UNIVERSITY
2020

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ อรอนงค์ เจริญไวย์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางทะเล ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	
....	.... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลฤดี สนธิ)	(ดร.แสงจันทร์ เสนาปิน)
	.... กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	(ดร.บัลลังก์ เนื่องแสง)
....	.... กรรมการ
(Dr.Ha Thanh Dong)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลฤดี สนธิ)
	.... กรรมการ
	(Dr.Ha Thanh Dong)

.... คณบดีคณะเทคโนโลยีทางทะเล

(ดร. สราวุธ ศิริวงศ์)

วันที่..........เดือน..........................พ.ศ...............

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางทะเล ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.นุจรี ไชยมงคล)

วันที่..........เดือน..........................พ.ศ...............

61910009: สาขาวิชา: เทคโนโลยีทางทะเล; วท.ม. (เทคโนโลยีทางทะเล)
คำสำคัญ: ตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลา, โรคไวรัสเกล็ดหลุด, SDDV, โรคปลากะพงขาว, การตรวจวินิจฉัย

อรอนงค์ เจริญไวย์ : การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลากะพงขาวและพาหะนำโรค. (Detection of scale drop disease virus (SDDV) from non-lethal samples of Asian seabass (*Lates calcarifer*) and its potential carriers) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: มลฤดี สนธิ, Ha Thanh Dong ปี พ.ศ. 2563.

โรคเกล็ดหลุด (Scale drop disease; SDD) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสสกุล Megalocytivirus Scale drop diseas virus (SDDV) ก่อให้เกิดความเสียหายในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลจะใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากอวัยวะภายในของปลา ซึ่งจำเป็นต้องทำลายปลา ดังนั้นการศึกษานี้เพื่อตรวจหา SDDV จากตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา (non-lethal samples) ได้แก่ เลือด เมือก และครีบหาง ทั้งในปลาป่วยและปลาปกติในช่วงเวลาที่มีการระบาด ด้วยเทคนิค semi-nested PCR จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างเลือด และเมือก มีการปรากฏของเชื้อไวรัส 100% จากตัวอย่างปลาป่วย (n=15) และปลาปกติ (n=5) จากนั้นใช้ตัวอย่างเลือดในการเฝ้าระวังเชื้อไวรัส SDDV โดยไม่ทำให้ปลาตาย ซึ่งทำการเก็บเลือดปลาปกติในกระชังเดิมหลังจากที่มีการระบาดของโรคเกล็ดหลุด 13 เดือน พบว่า มีการติดเชื้อไวรัสในเลือด 1/20 ตัวอย่าง ทั้งนี้ยังตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* จากเนื้อเยื่อปลาที่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV ร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV ในปรสิตภายนอกบริเวณเหงือกปลา กลุ่ม *Lernanthropus* sp. และ *Diplectanum* sp. ที่เก็บในช่วงที่มีการระบาดของโรค แสดงให้เห็นว่าปรสิตเหล่านี้มีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลา งานวิจัยนี้มีประโยชน์อย่างมากในการนำตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลามาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสและติดตามสุขภาพปลาที่มีการติดเชื้อ SDDV ในฟาร์มเลี้ยงปลากะพงขาวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และอาจนำมาใช้กับพ่อแม่พันธุ์

61910009: MAJOR: MARINE TECHNOLOGY; M.Sc. (MARINE TECHNOLOGY)

KEYWORDS: non-lethal samples, detection, scale drop disease, SDDV, Asian seabass disease

ONANONG CHAROENWAI : DETECTION OF SCALE DROP DISEASE VIRUS (SDDV) FROM NON-LETHAL SAMPLES OF ASIAN SEABASS (*LATES CALCARIFER*) AND ITS POTENTIAL CARRIERS. ADVISORY COMMITTEE: MOLRUEDEE SONTHI, , HA THANH DONG 2020.

Scale drop disease (SDD) caused by a novel Megalocytivirus, scale drop disease virus (SDDV), has been reported causing severe economic losses for affected farmed Asian seabass (*Lates calcarifer*) in Southeast Asian countries. Detection of SDDV is currently relied on lethal samples. Therefore, this study aimed to detect SDDV from non-lethal samples (blood, mucus and caudal fin) of both clinically sick and healthy Asian seabass during the disease outbreak, using semi-nested PCR method. The result revealed that the prevalence of SDDV in blood and mucus were 100% from both clinically sick (n=15) and healthy fish (n=5). Blood samples were then used for non-lethal surveillance of SDDV in the asymptomatic fish collected from the same farm 13 months after the disease outbreak. The results showed that 1/20 blood samples were tested positive for SDDV. Co-infections of SDDV and *Vibrio harveyi* were also detected from the fish tissues. Interestingly, this study also revealed that two-gill ectoparasites, *Lernathropus* sp. and *Diplectanum* sp., collected from affected fish during the disease outbreak were all tested positive for SDDV, indicating that these parasites are a useful non-lethal sample type for non-lethal detection of SDDV. In summary, non-lethal samples offer great advantages in the diagnosis and monitoring of SDDV infection in economically important farmed Asian seabass and possibly broodstock.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหิดล และผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) Grant no. SCA-CO-2562-9786-TH และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. มลฤดี สนธิ คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ดร. แสงจันทร์ เสนาปิน หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และ Dr. Ha Thanh Dong คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ที่คอยให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือทุกอย่างจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้ขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาที่ได้ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณคณะกรรมการ ดร. บัลลังก์ เนื่องแสง รวมถึงหน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

อรอนงค์ เจริญไวย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง .... ญ

สารบัญรูปภาพ .... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 2

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 ปลากะพงขาว 4

2.1.1 อนุกรมวิธานปลากะพงขาว 4

2.1.2 ลักษณะทั่วไป 5

2.1.3 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์ 5

2.2 โรคเกล็ดหลุด (Scale drop disease: SDD) 6

2.2.1 การตรวจวินิจฉัยโรคเกล็ดหลุดในประเทศไทย 8

2.3 การระบาดของโรค (Epidermiology) 12

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค semi-nested PCR 13

2.5 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis 14

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 20
3.1 Animal ethic 20
3.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง 20
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 20
3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 21
3.5 วิธีดำเนินการวิจัย 22
3.5.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง 22
3.5.2 การสกัด DNA 23
3.5.3 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดด้วยวิธี Semi-nested PCR 23
3.5.4 การวิเคราะห์ผล PCR product โดยใช้เทคนิค Gel Electrophoresis 25
3.5.5 การหาปริมาณไวรัส SDDV ในตัวอย่างกลุ่ม non-lethal ด้วยเทคนิค Quantitative PCR 25
3.5.6 การตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ด้วยเทคนิค PCR 25
3.5.7 วิธีการติดตามสุขภาพปลากะพงขาว โดยใช้ตัวอย่างเลือดในการตรวจหาเชื้อไวรัส SDDV (recommended protocol) 26
3.5.8 แผนงานวิจัย 27
บทที่ 4 ผลการทดลอง 28
4.1 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากตัวอย่างที่ต้องทำลายปลาและไม่ต้องทำลายปลา 28
4.2 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากตัวอย่างปรสิตภายนอก 32
4.3 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากสิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยง 35
4.4 การประยุกต์ใช้ตัวอย่างเลือดในการติดตามสุขภาพปลากะพงขาว 35
4.5 การตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR 35
4.5.1 แบคทีเรีย 36

4.5.2 เนื้อเยื่อ 36

4.6 วิเคราะห์คุณภาพน้ำในกระชังจากฟาร์ม 1 39

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล 40

5.1 อภิปรายผล...40

5.2 สรุปผล...42

5.3 ข้อเสนอแนะ 42

ภาคผนวก ก 43

บรรณานุกรม 49

ประวัติย่อของผู้วิจัย 50

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขั้นที่ 1 (1st step PCR)....23

ตารางที่ 2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ขั้นที่ 1 (1st step PCR) 24

ตารางที่ 3 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขั้นที่ 2 (semi-nested PCR)....24

ตารางที่ 4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ขั้นที่ 2 (semi-nested PCR) 24

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค....26

ตารางที่ 6 แผนการดำเนินงานวิจัย....27

ตารางที่ 7 ผลการตรวจเชื้อไวรัส SDDV ในตัวอย่างที่ทำลายปลาและไม่ทำลายปลาจากปลาป่วยและปลาปกติที่เก็บมาจาก 2 ฟาร์ม....30

ตารางที่ 8 ปริมาณไวรัส SDDV จากตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลา ด้วยเทคนิค qPCR....31

ตารางที่ 9 จำนวนปรสิตภายนอกที่พบในเหงือกปลาและผลการตรวจเชื้อไวรัส SDDV จากปรสิต 34

ตารางที่ 10 ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากะพงขาว 22 เชื้อ....37

ตารางที่ 11 ผลการตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ ในเนื้อเยื่อปลากะพงขาวจาก 2 ฟาร์ม....38

ตารางที่ 12 ค่าคุณภาพน้ำบริเวณฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว อ.แหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี 39

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพภายนอกของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) 4

ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของปลากะพงขาว 6

ภาพที่ 3 Phylogenetic of Iridoviridae family 6

ภาพที่ 4 ลักษณะและโครงสร้างของไวรัส....................................7

ภาพที่ 5 ลักษณะอาการของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อไวรัส SDDV 7

ภาพที่ 6 ลักษณะพยาธิสภาพของโรคไวรัส SDDV 9

ภาพที่ 7 อนุภาคของไวรัส SDDV 9

ภาพที่ 8 การสกัดไวรัสให้มีความบริสุทธิ์ ด้วยวิธี sucrose gradient ultracentrifugation....................9

ภาพที่ 9 ผลการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุด ด้วยเทคนิค semi-nested PCR 11

ภาพที่ 10 Phylogenetic tree ของโรคไวรัส SDDV ที่แยกได้จากประเทศไทย................................11

ภาพที่ 11 วงจรการติดเชื้อ....................................12

ภาพที่ 12 การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR 14

ภาพที่ 13 ขั้นตอนการทำ PCR....................................14

ภาพที่ 14 ภาพรวมของการทำ Gel electrophoresis....................................15

ภาพที่ 15 แผนที่เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวในจังหวัดจันทบุรี ฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว อำเภอแหลมสิงห์ และฟาร์ม 2 บ่อดินหมู่บ้านอัมพวา อำเภอท่าใหม่....................................20

ภาพที่ 16 วิธีการตรวจสุขภาพปลากะพงขาว โดยใช้ตัวอย่างเลือด 27

ภาพที่ 17 ตัวอย่างปลากะพงขาวจากฟาร์ม 1 A) ปลาป่วย B) ปลาปกติไม่แสดงอาการ และฟาร์ม 2 C) ปลาปกติ 28

ภาพที่ 18 แสดงผลการตรวจยีน ATPase ของไวรัส SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ซึ่งมีขนาดยีน 412 และ 738 bp ในอวัยวะต่างๆของปลาป่วยตัวที่ 13 ได้แก่ ตับ (L, Liver) ไต (K, Kidney) ม้าม (S, Spleen) เหงือก (G, Gill) สมอง (BR, Brain) ตา (E, Eye) กล้ามเนื้อ (MS, Muscle) เลือด (BL,

Blood) เมือก (MU, Mucus) และครีบหาง (F, Caudal fin) M คือ 100 bp DNA ladder; N คือ ตัวควบคุมลบ (Negative control); P คือ ตัวควบคุมบวก (Positive control)..31

ภาพที่ 19 การเข้าเกาะของปรสิต Lernanthropus sp. (a) และ Diplectanum sp. (b) บริเวณซี่เหงือก (gill filaments) ของปลากะพงขาว..32

ภาพที่ 20 ลักษณะของโคพีพอด Lernanthropus sp. (a) และปลิงใส Diplectanum sp. (b) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..32

ภาพที่ 21 แสดงผลการตรวจโรคไวรัส SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR จากปรสิต (L, Lernanthropus sp. and D, Diplectanum sp.) ที่พบในเหงือกปลาป่วยตัวที่ 14-15 และปลาปกติไม่แสดงอาการตัวที่ 16-17 จากฟาร์ม 1; M คือ 100 bp DNA ladder; N คือ ตัวควบคุมลบ (Negative control); P คือ ตัวควบคุมบวก (Positive control)..33

ภาพที่ 22 สิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยงปลากะพงขาวจากฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว...............................35

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การระบาดของโรคเกล็ดหลุดที่เกิดจากเชื้อไวรัส (Scale drop disease virus; SDDV) มีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงปลากะพงขาว มีรายงานการพบไวรัส SDDV ที่ประเทศสิงคโปร์ อินโดนีเซีย และมาเลเซียในปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชัง ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Gibson-Kueh et al., 2012; Nurliyana et al., 2020) สำหรับในประเทศไทยพบเชื้อไวรัส SDDV ในปลากะพงขาวที่เลี้ยงทั้งในบ่อดินและกระชัง ในปี 2558 (Senapin et al., 2019) ไวรัสชนิดนี้เป็นดีเอ็นเอไวรัสสายคู่มีขนาดประมาณ 131 กิโลเบส อนุภาคเป็นรูปทรงหกเหลี่ยม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 130-200 นาโนเมตร ลักษณะอาการทั่วไปของปลาที่ติดเชื้อไวรัส SDDV จะมีลำตัวสีดำ เกล็ดหลุด หางและครีบกร่อน เหงือกซีด บางครั้งอาจมีอาการตาโปน และท้องแดงร่วมด้วย โดยมีอัตราการตายประมาณ 40-50% โดยเฉพาะระยะวัยรุ่น (juvenile) และตัวเต็มวัย (adult) (de Groof et al., 2015; Nurliyana et al., 2020; Senapin et al., 2019) จากการศึกษาการระบาดของไวรัสชนิดนี้ ในพื้นที่การเลี้ยงปลาที่มีการปรากฏของไวรัส SDDV พบว่าเป็นแบบ opportunistic infection โดยจะมีการระบาดเมื่อสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเห็นชัดมากที่สุด เมื่ออุณหภูมิน้ำลดต่ำลง และการเคลื่อนย้ายปลา ปัจจัยดังกล่าวนี้สามารถส่งเสริมให้ปลามีการยอมรับเชื้อมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าในพื้นที่ที่มีการระบาดมาก่อน มักจะมีโอกาสระบาดซ้ำอยู่เสมอ สำหรับการตายของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อจะเป็นแบบเรื้อรัง (chronic) ซึ่งจะมีการตายต่อเนื่อง และติดต่อกันระหว่างปลาในกระชัง ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนสำหรับป้องกันไวรัสชนิดนี้ การควบคุมโดยการเข้มงวดในระบบ biosecurity และการตรวจสอบปลาที่เป็นพาหะนำเชื้อ หรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อาจเป็นพาหะของโรคนี้ จึงมีความจำเป็นอย่างมากต่อการป้องกันการติดต่อหรือการแพร่กระจายของ SDDV ในปลา อย่างไรก็ตามในการควบคุมการระบาด จำเป็นต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการติดต่อ (route of transmission) ของโรคนี้ในปลากะพงขาว รวมทั้งสิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยงอื่น ๆ ที่อาจเป็นพาหะนำโรคเกล็ดหลุด

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเกล็ดหลุดในปลากะพงขาว ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ถูกพัฒนาขึ้นให้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส SDDV ที่ติดเชื้อในอวัยวะภายในของปลา (lethal) ได้แก่ ตับ ไต ม้าม และสมอง (Charoenwai, Meemetta, Sonthi, Dong, & Senapin, 2019) แต่ยังไม่มีการตรวจหาเชื้อไวรัสนี้ในตัวอย่างกลุ่ม non-lethal เช่น เลือด เมือก และครีบหาง เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรากฏของเชื้อไวรัส SDDV ในเลือด เมือก และครีบหางของปลากะพงขาว รวมทั้งสิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยงที่อาจเป็นพาหะนำโรคของไวรัสชนิดนี้ เพื่อให้ได้ข้อมูลเส้นทางการติดต่อ (route of transmission) การแพร่กระจายของเชื้อ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในงานระบาดวิทยา รวมทั้งลดการฆ่าปลา สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์ นำไปสู่การได้รับข้อมูลการระบาดที่ครบถ้วน สมบูรณ์ และสามารถนำข้อมูลนี้ไปถ่ายทอดให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในระบบอนุบาล (hatchery) บ่อดิน และในกระชัง เป็นการลดความสูญเสียของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อไวรัส SDDV ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส SDDV จากตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลา ได้แก่ เลือด เมือก และครีบหาง

1.2.2 เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส SDDV จากตัวอย่างเนื้อเยื่อปลากะพงขาว ปรสิตภายนอก รวมทั้งสิ่งมีชีวิตในน้ำที่อาจเป็นพาหะนำโรคในช่วงเวลาที่มีการระบาด

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.3.1 ทราบข้อมูลการแพร่กระจายของเชื้อ และทราบถึงชนิดของพาหะนำโรคเกล็ดหลุดซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในงานระบาดวิทยา

1.3.2 ลดการฆ่าปลา สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์ นำไปสู่การได้รับข้อมูลการระบาดที่ครบถ้วน สมบูรณ์ และสามารถนำข้อมูลนี้ไปถ่ายทอดให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลา เพื่อลดความสูญเสียของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อไวรัส SDDV

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 เก็บตัวอย่างปลากะพงขาว ฟาร์ม 1 จากกระชังคลองพลิ้ว ปากแม่น้ำแหลมสิงห์ อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ปลากะพงขาวที่มีอาการป่วยในกระชัง จำนวน 15 ตัว กลุ่มที่ 2 ปลากะพงขาวที่ไม่แสดงอาการในกระชังเดียวกัน จำนวน 5 ตัว และฟาร์ม 2 ปลากะพงขาวปกติจากบริเวณหมู่บ้านอัมพวา อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (Reference site) จำนวน 5 ตัว โดยทำการศึกษาตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2563

1.4.2 เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยงที่อาจเป็นพาหะนำโรคของเชื้อ ได้แก่ หอยขี้นก หอยนางรม อย่างละ 10 ตัว และอาหารปลาสดบด (ปลาเหยื่อ) ซึ่งทำการเก็บบริเวณกระชังที่มีการ

ระบาดของเชื้อไวรัส SDDV รวมทั้งปรสิตภายนอกในเหงือกปลา ได้แก่ *Lernantropus* sp. และ *Diplectanum* sp.

1.4.3 ศึกษาการปรากฏของเชื้อไวรัส SDDV ในเลือด เมือกและครีบหางของปลาแต่ละตัว ปรสิตภายนอก และตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยง ด้วยเทคนิค semi-nested PCR (Charoenwai et al., 2019) และศึกษาปริมาณไวรัสในตัวอย่างเลือด เมือก และครีบหาง ด้วยเทคนิค qPCR ตามวิธีการของ Sriisan et al. (2020)

มหาวิทยาลัยบูรพา BURAPHA UNIVERSITY

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลากะพงขาว

ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพภายนอกของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

2.1.1 อนุกรมวิธานปลากะพงขาว

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Class: Actinopterygii

Order: Perciformes

Family: Latidae

Genus: *Lates*

Species: *calcarifer*

ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ มีชื่อสามัญที่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย คือ Asian seabass และมีชื่อภาษาอังกฤษที่องค์การอาหารและเกษตรสหประชาชาติ (FAO) ใช้อยู่ คือ Barramundi หรือ Giant sea perch (Aquaculture, 1996) ส่วนแหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่บริเวณมหาสมุทรอินเดียและมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันตก ซึ่งอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และชายฝั่งออสเตรเลีย (Fulton-Howard, 2008)

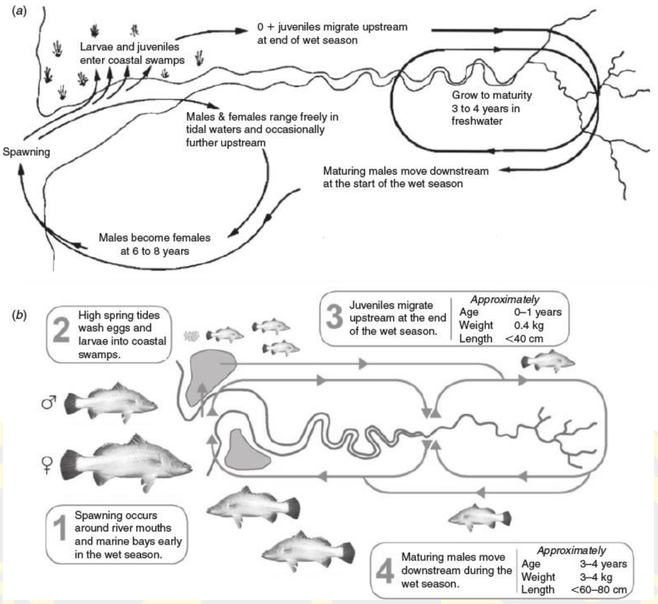
BURAPHA UNIVERSITY

2.1.2 ลักษณะทั่วไป

ลักษณะภายนอกของปลากะพงขาว เป็นปลาที่มีลำตัวยาว ด้านข้างแบน หัวโต จงอยปากค่อนข้างแหลมและยาว นัยน์ตาโต ปากกว้างยืดหดได้ ฟันเป็นฟันเขี้ยวอยู่บนขากรรไกรบนล่าง คอดหางมีขนาดใหญ่และแข็งแรง เกล็ดขนาดใหญ่เป็นแบบ ctenoid ครีบหลังมีก้านครีบแข็งประมาณ 7-9 และก้านครีบอ่อนประมาณ 10-11 ครีบอกสั้นและครีบหางมีลักษณะกลม พื้นลำตัวมีสีขาวเงินปนน้ำตาล แนวสันท้องมีสีขาวเงิน (Aquaculture, 1996) มีขนาดความยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร ดังภาพที่ 1 พบปลากะพงขาวตัวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดถึง 2 เมตร และมีน้ำหนักถึง 55 กิโลกรัม (Fulton-Howard, 2008)

2.1.3 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

ปลากะพงขาวอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ปลากะพงขาวตัวเต็มวัย (adult) จะกินปลา และกุ้งเป็นอาหาร อพยพจากน้ำจืดไปยังปากแม่น้ำหรือน้ำกร่อย เพื่อผสมพันธุ์และวางไข่ ซึ่งวางไข่ในช่วงพระจันทร์เต็มดวงและน้ำขึ้นน้ำลง หลังจากการปฏิสนธิ 24 ชั่วโมง ตัวอ่อน (larvae) ที่ฟักแล้วยังพัฒนาไม่สมบูรณ์จะได้รับสารอาหารจากไข่แดง ตัวเมียขนาดใหญ่สามารถวางไข่ได้ถึง 40 ล้านฟอง แต่ 90% ของตัวอ่อนตายภายใน 2-3 สัปดาห์ ในช่วงน้ำขึ้นน้ำลงสูงได้พัดให้ไข่และตัวอ่อนไปยังป่าชายเลน หลังจาก 2-3 วัน ตาและปากเปิด ตัวอ่อนเริ่มหาอาหารคือ zooplankton เมื่อเข้าสู่ระยะ juvenile กินปลาขนาดเล็กเป็นอาหาร อพยพไปยังแม่น้ำหรือน้ำจืดและเมื่อเข้าสู่ตัวเต็มวัยก็จะย้ายกลับมาน้ำเค็ม ดังภาพที่ 2 เพื่อเปลี่ยนจากเพศผู้ไปเป็นเพศเมีย เพศผู้จะต้องมีอายุประมาณ 3-4 ปี ความยาวประมาณ 80 เซนติเมตร และกลับมาที่ปากแม่น้ำหรือน้ำกร่อยเพื่อผสมพันธุ์และวางไข่ (Fulton-Howard, 2008)

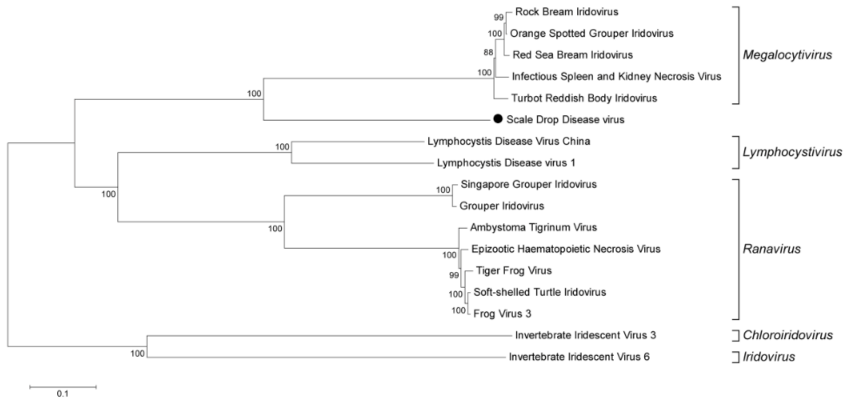


ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของปลากะพงขาว

ที่มา : Crook et al. (2016)

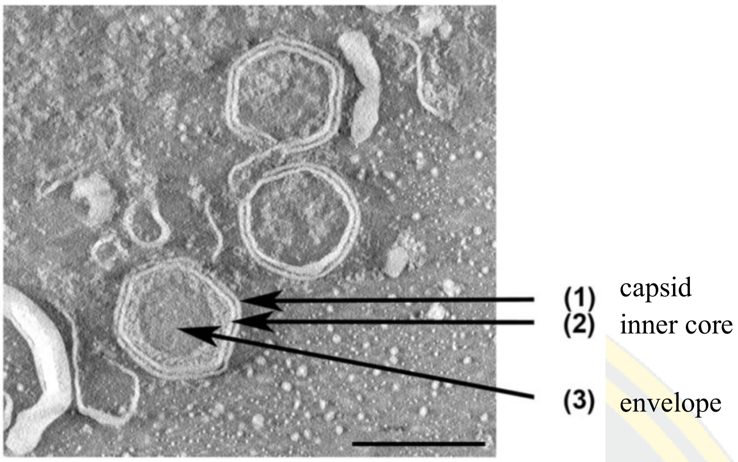
2.2 โรคเกล็ดหลุด (Scale drop disease: SDD)

Scale drop disease virus (SDDV) เป็นดีเอ็นเอไวรัสสายคู่ขนาดประมาณ 131 กิโลเบส (kb) อนุภาคมีรูปทรงหกเหลี่ยม (hexagonal) มีสมมาตรเป็นรูปลูกบาศก์ 12 มุม (icosahedral symmetry) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 130-200 นาโนเมตร ดังภาพที่ 4 จัดอยู่ในวงศ์ Iridoviridae ประกอบด้วย 5 genus ซึ่ง 3 genus พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังจำพวกปลา สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ครึ่งน้ำครึ่งบก ได้แก่ *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* และ *Magalocytivirus* ส่วนอีก 2 genus พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวกแมลง กุ้ง กั้ง ปู หอย และหมึก ดังภาพที่ 3 ซึ่งไวรัส SDDV จัดอยู่ใน genus *Magalocytivirus* เป็น genus ที่ก่อให้เกิดโรคไวรัสในปลาเขตร้อนพบได้ในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (de Groof et al., 2015; Nurliyana et al., 2020)



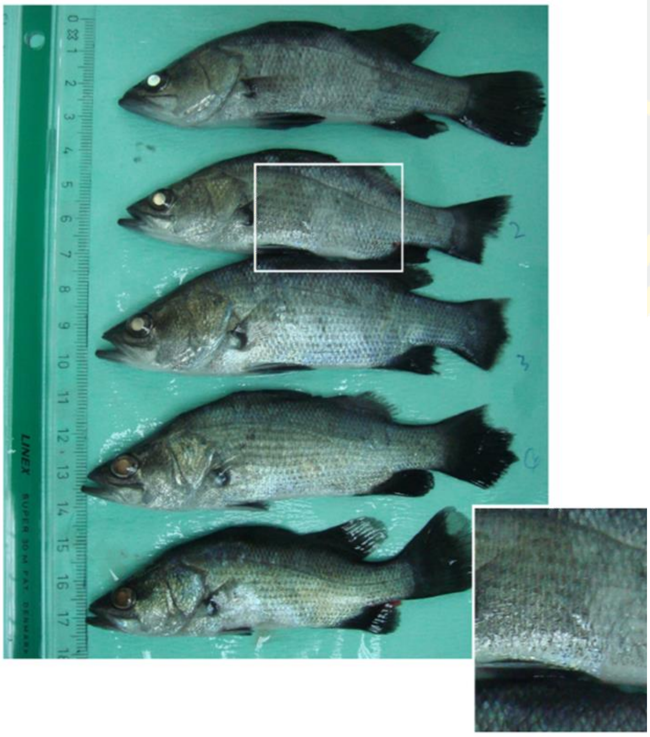
ภาพที่ 3 Phylogenetic of Iridoviridae family

ที่มา : de Groof et al. (2015)



ภาพที่ 4 ลักษณะและโครงสร้างของไวรัส

ปลากะพงขาวที่ติดเชื้อไวรัส SDDV จะมีลักษณะลำตัวสีดำ เกล็ดหลุด หางและครีบกร่อน เหงือกซีด ตาโปน ดังภาพที่ 5 และเกิดการอักเสบของหลอดเลือดทำให้ไหลเวียนไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายไม่ได้ จึงทำให้กล้ามเนื้อตาย โรคไวรัส SDDV ติดเชื้อในปลากะพงขาวได้ทั้งในระยะวัยรุ่น (juvenile) และตัวเต็มวัย (adult) โดยมีอัตราการตายประมาณ 50% (de Groof et al., 2015)



ภาพที่ 5 ลักษณะอาการของปลากะพงขาวที่ติดเชื้อไวรัส SDDV

2.2.1 การตรวจวินิจฉัยโรคเกล็ดหลุดในประเทศไทย

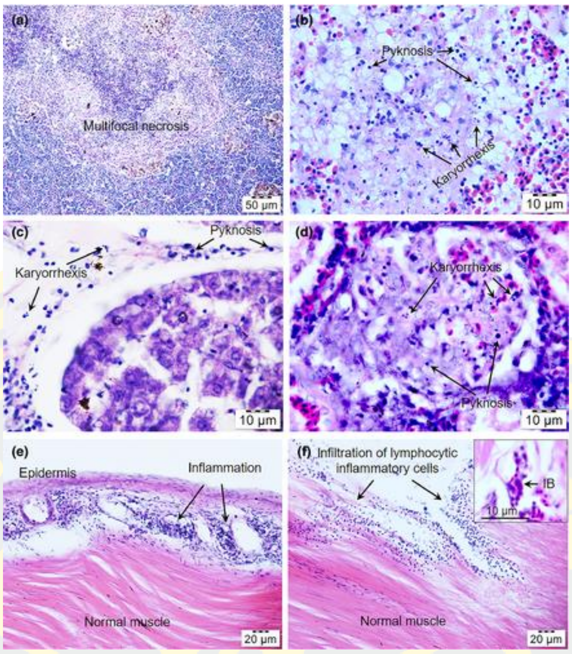
การตรวจวินิจฉัยโรคเกล็ดหลุด เพื่อให้สามารถวินิจฉัยหาสาเหตุของการเกิดโรค อาการ หรือความผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในปลากะพงขาว มีเทคนิคการตรวจวินิจฉัยดังนี้

1. ลักษณะทางพยาธิสภาพของโรค (Histopathology)

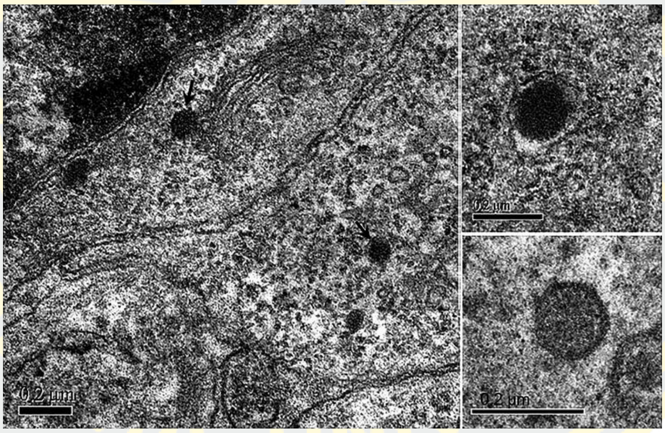
นำเนื้อเยื่อตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อ เก็บไว้ในสารละลาย 10% neutral-buffered formalin (1:10 w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ใน 70% ethanol จากนั้นใช้เทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา โดยนำน้ำออกจากเซลล์ ฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟิน เพื่อตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 4-5 µm และย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี haematoxylin และ eosin จากนั้นนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 6 พบว่า บริเวณม้ามเกิดกล้ามเนื้อตายหลายตำแหน่ง จึงทำให้เซลล์ตาย (a) นอกจากนี้นิวเคลียสยังหดตัวแน่น เรียกว่า pyknosis จนมีการแตกหักเป็นชิ้นเล็ก ๆ เรียกว่า karyorrhexis (b) ส่วนตับ (c) ไต (d) มีรอยโรคคล้ายกับม้าม และเกิดการอักเสบบริเวณกล้ามเนื้อ (e,f) ซึ่งเวลาที่ไวรัสอยู่ในเซลล์จะแทรกซึมเข้าไปใน lymphocyte และรวมตัวกันเป็นกลุ่มใหญ่ เรียกว่า inclusion body ซึ่งไม่พบเซลล์แบคทีเรียในเนื้อเยื่อ (Senapin et al., 2019)

2. โครงสร้างหรืออนุภาคของไวรัส

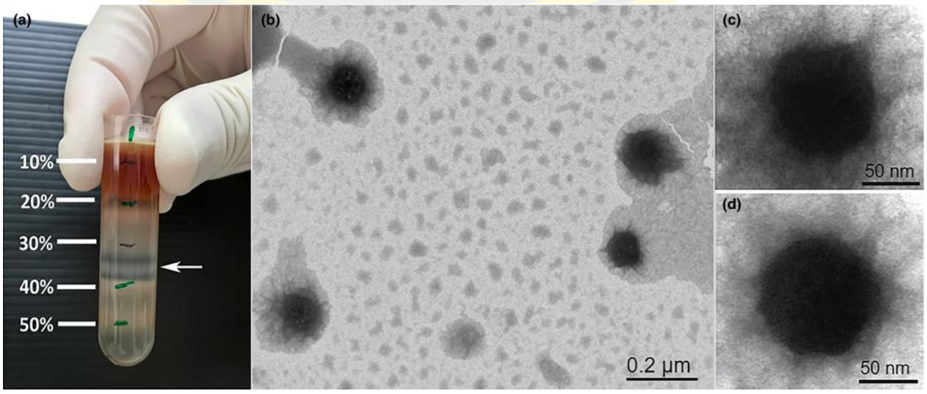
ศึกษาโครงสร้างหรืออนุภาคของไวรัส โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) นำตัวอย่างม้ามและไตขนาดเล็ก ทำการตรึงเซลล์ไว้ใน 2.5% glutaraldehyde . ในสารละลาย 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งในการเตรียมตัวอย่างจะใช้สารละลาย osmium tetroxide จากนั้นฝังเนื้อเยื่อลงในเรซิน และทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง ultra-microtome ดังภาพที่ 7 พบอนุภาคของไวรัสในเซลล์ไซโทพลาสซึมของทั้งม้ามและไต อนุภาคของไวรัสมีเปลือกหุ้ม มีลักษณะคล้ายรูปหกเหลี่ยม เส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 100-180 nm (Senapin et al., 2019)



ภาพที่ 6 ลักษณะพยาธิสภาพของโรคไวรัส SDDV



ภาพที่ 7 อนุภาคของไวรัส SDDV



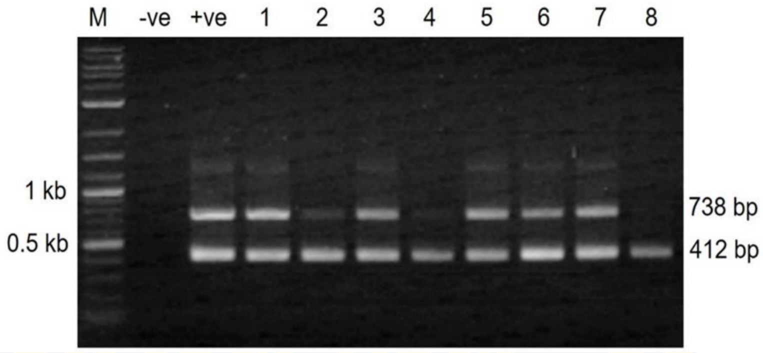
ภาพที่ 8 การสกัดไวรัสให้มีความบริสุทธิ์ ด้วยวิธี sucrose gradient ultracentrifugation

3. การสกัดไวรัสให้มีความบริสุทธิ์

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อที่แช่แข็งไว้ (-20 ºC) ประมาณ 1 กรัม บดเนื้อเยื่อในสารละลาย TNE buffer 1 mL ซึ่งประกอบด้วยสารละลายผสมดังนี้ 20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 7.4 นำมากรองด้วยตัวกรองที่มีเมมเบรนขนาด 100- และ 40- ไมครอน จากนั้นนำตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้วมา 500 µL ใส่ลงในสารละลายซูโครส 10-50% (w/w) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 100,000 xg อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า สังเกตเห็นแบนที่เกิดขึ้นอยู่ระหว่าง 30-40% ดังภาพที่ 8 (a) จากนั้นนำมาไปปั่นเหวี่ยงที่ 200,000 xg อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไวรัสที่มีความบริสุทธิ์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า มีอนุภาคของไวรัสเหมือนกัน (b-d) มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 100-110 nm (Senapin et al., 2019)

4. semi-nested PCR

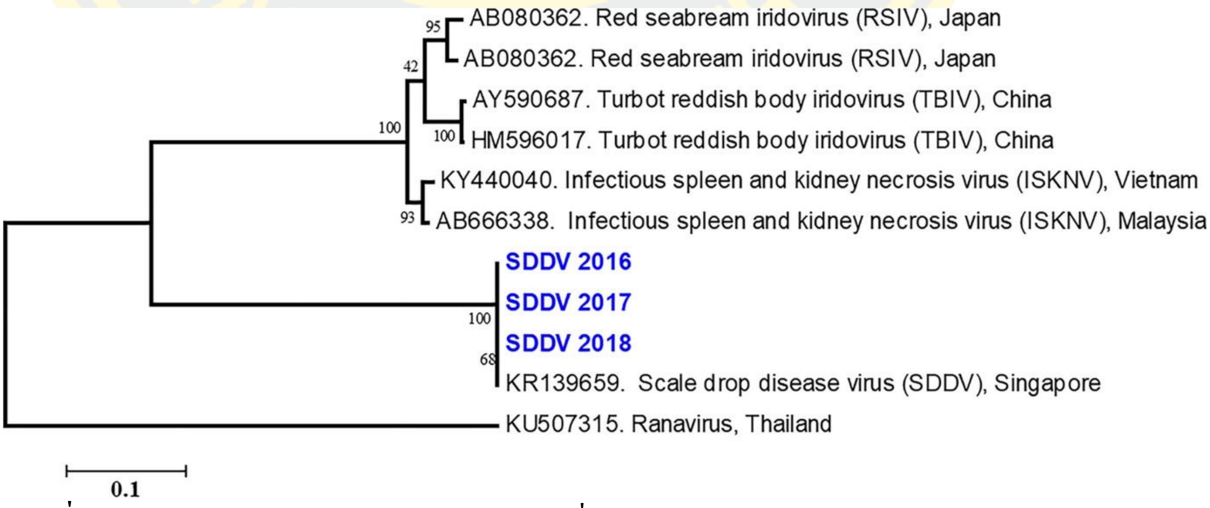
ทำการยืนยันเชื้อไวรัสเกล็ดหลุด ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (DNA amplification) โดยไม่อาศัยเซลล์ของสิ่งมีชีวิต นำตัวอย่างตับ ไต มาสกัดดีเอ็นเอ ใช้ phenol-chloroform หรือชุดสกัด นำไปวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีอยู่ในช่วง 1.7-1.8 จากนั้นเจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอ 100 ng/µL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ºC เพื่อนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค semi-nested PCR ต่อไป จากการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคนี้ พบว่า วิธีการตรวจนี้มีความจำเพาะ (Specificity) กับสารพันธุกรรมของไวรัส SDDV โดยใช้เชื้อก่อโรคต่าง ๆ ในปลา ดังนี้ *Streptococcus iniae*, *V. haveyi*, *V. parahemolyticus XN89*, *V. vulnificus*, VNN, ISKNV, *V. tubiashi*, *T. litopenaei*, *Nocardia*, *V. alginolyticus*, *Pleisiomas shigelloides* และ *V. cholera* และมีความไว (Sensitivity) ในการตรวจพบไวรัส 100 copies/µL (Charoenwai et al., 2019) จากการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากปลากะพงขาวที่เก็บจากฟาร์มในภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ในปี 2016 ถึง 2018 พบปลากะพงขาวป่วยที่มีลักษณะอาการเหมือนกับโรคไวรัสเกล็ดหลุด (lane 1-8) จังหวัดจันทบุรี ซึ่งถ้าพบแบนเดียวที่ 412 bp แสดงว่า มีการติดเชื้อเล็กน้อย แต่ถ้าขึ้นทั้ง 2 แบน คือ 738 และ 412 bp แสดงว่ามีการติดเชื้ออย่างหนัก ดังภาพที่ 9 (+ve คือ ตัวควบคุมบวก และ –ve คือ ตัวควบคุมลบ)



ภาพที่ 9 ผลการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุด ด้วยเทคนิค semi-nested PCR

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัส และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic analysis)

ทำการโคลนยีน Major capsid protein (MCP) และวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า มีกรดอะมิโนแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยระหว่างไวรัสที่แยกได้จากประเทศไทยและสิงคโปร์ ซึ่งในส่วนของยีน MCP (ORF 060L) และส่วนอื่นอีก 3 ORFs (030L, 035L และ 061L) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แยกได้แตกต่างกัน เท่ากับ 98.7%, 99.9% และ 99.9% ตามลำดับ และจำนวนกรดอะมิโนที่ลดลง เท่ากับ 98.3%, 99.6% และ 99.6% ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า มีจำนวนกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป 1 หรือ 2 ตำแหน่งใน ORFs 035L และ 061L ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับเบสของยีน MCP ในวงศ์ Iridoviridae พบว่า มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ SDDV สิงคโปร์ (Senapin et al., 2019)

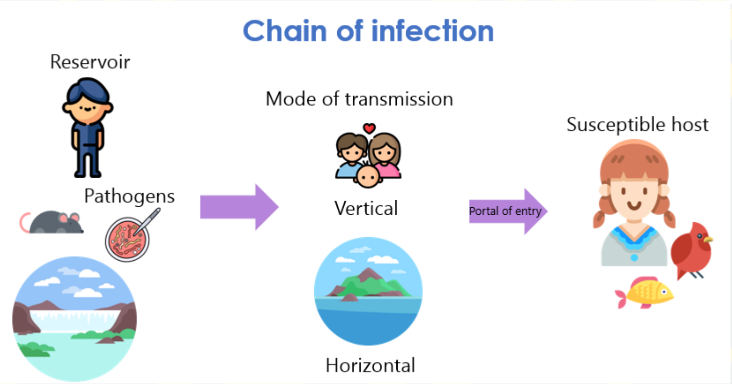


ภาพที่ 10 Phylogenetic tree ของโรคไวรัส SDDV ที่แยกได้จากประเทศไทย

6. Quantitative PCR

ทำการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุด ด้วยเทคนิค qPCR ซึ่งมีความจำเพาะและสามารถตรวจพบปริมาณไวรัสได้น้อยที่สุด 2 copies/reaction โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ ATPase ของ SDDV (Sriisan et al., 2020)

2.3 การระบาดของโรค (Epidermiology)



ภาพที่ 11 วงจรการติดเชื้อ

การศึกษาการระบาดมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เพื่อค้นหาโรคในระยะเริ่มแรก ลดโอกาสการแพร่กระจายของเชื้อโรค และการกระจายของโรคในแต่ละพื้นที่ นำไปสู่การตรวจวินิจฉัย ซึ่งสามารถบ่งบอกเปอร์เซ็นต์ความชุกที่เป็นตัวชี้วัดการเกิดของโรคในแต่ละพื้นที่การเลี้ยงปลากะพงขาว วงจรการติดเชื้อหรือห่วงโซ่ของการระบาด เป็นผลที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลชีพก่อโรค ผู้รับเชื้อ ไม่ว่าจะเป็นคนหรือสัตว์ และสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ซึ่งทำให้เกิดการติดต่อจากแหล่งเชื้อโรค ไปยังผู้ติดเชื้อใหม่ที่ยอมรับเชื้อนั้น ๆ ทั้งในแนวดิ่งและแนวราบ ทั้งนี้การควบคุมโรคหรือการป้องกันการระบาดจะอาศัยการตัดวงจรเหล่านี้ เพื่อไม่ให้เกิดการติดเชื้อที่ครบวงจร (Snow, 2011) ดังภาพที่ 11

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค semi-nested PCR

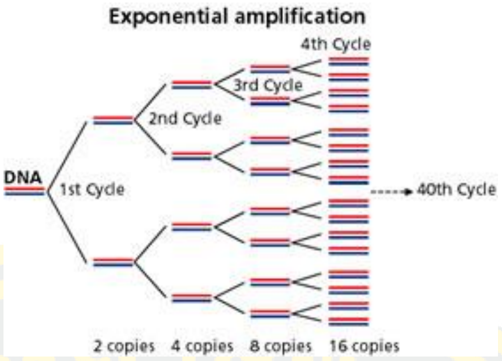
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค semi-nested PCR เป็นเทคนิคที่ต้องการ PCR product มากขึ้น โดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 2 ขั้นตอนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ ATPase ของ SDDV ซึ่งไพรเมอร์คู่แรกจะใช้ในขั้นตอนแรกและไพรเมอร์คู่แรกจะอยู่รอบนอกสุด หลังจากนั้นนำ PCR product ในขั้นตอนแรกไปทำปฏิกิริยาในขั้นตอนที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 แต่ไพรเมอร์สายแรกเหมือนกันกับไพรเมอร์คู่แรก สำหรับเพิ่มขยายได้เฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมายและอยู่ถัดเข้าไปจากไพรเมอร์คู่แรก ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยการใช้ความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนที่จับกันอยู่ระหว่างเบสแต่ละคู่ เรียกว่า การเสียสภาพ (Denaturation) การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพนิยมใช้อุณหภูมิ 94-95 °C

ขั้นตอนที่ 2 เรียกว่า Annealing หรือการคืนสภาพ (Renaturation) คือการกลับคืนสู่ธรรมชาติของดีเอ็นเอ โดยการทำ Hybridization ระหว่างสายเดี่ยวของดีเอ็นเอเป้าหมายกับสายเดี่ยวของไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์จะจับที่ปลาย 3’ ของสายเดี่ยวดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นเบสคู่สมกัน ขั้นตอนนี้ต้องลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเป็น 60 °C

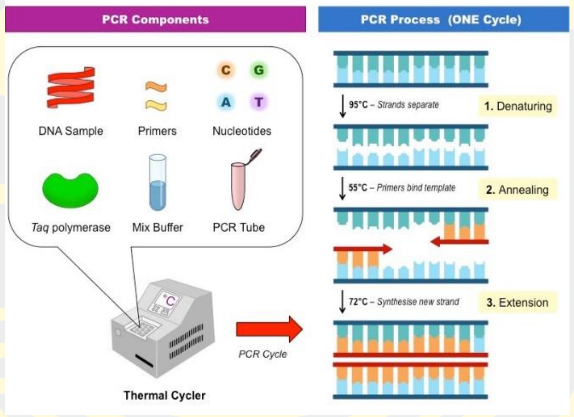
ขั้นตอนที่ 3 เรียกว่า Extension โดยเอนไซม์ Polymerase จะทำการสังเคราะห์ส่วนของ ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ในทิศทาง 5’ ไป 3’ ใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นแม่แบบ ซึ่งจะใช้ *Taq* DNA Polymerase ที่มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 95 °C รวมกับดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ จึงทำให้สามารถเติมสารทุกอย่างที่ต้องการใช้ในการทำ PCR ตั้งแต่รอบแรกจนถึงรอบสุดท้าย โดยมีการเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 72 °C เพื่อให้เหมาะกับการทำงาน ดังภาพที่ 13 ทำให้มีการสังเคราะห์พอลินิวคลีโอไทด์สายใหม่ที่มีเบสคู่สมกับสายแม่แบบเดิม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ไปหลาย ๆ รอบจนได้จำนวนที่ต้องการ

ในแต่ละรอบของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังกล่าว โดยทุกๆรอบจะมีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายได้เป็น 2 เท่า โดยจำนวนผลผลิต PCR คำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) ปัจจุบันเครื่อง PCR ได้มีการตั้งโปรแกรมปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนอย่างอัตโนมัติ แต่ละรอบของ PCR จะใช้เวลา 1-2 นาที ดังนั้นจึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เป็นล้าน ๆ ชิ้น ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR

ที่มา :http://www.falaboratories.com/lab-services/microbiology/pcr-analysis/procedure/step78.asp



ภาพที่ 13 ขั้นตอนการทำ PCR

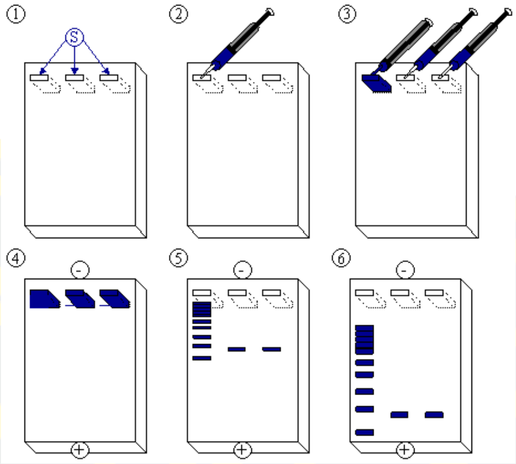
ที่มา : http://www.ib.bioninja.com.au/_Media/pcr-components_med.jpeg

2.5 การวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่ประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ จึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวล

โมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ ดังภาพ 2-14



ภาพที่ 14 ภาพรวมของการทำ Gel electrophoresis

ที่มา: http://ku-scmicro36bkk.tripod.com/PCR.html

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Burbank, Fehringer, and Chiaramonte (2017) ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรค infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) ในปลาเรนโบว์เทราต์ ด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์ โดยเลือกตัวอย่างในกลุ่ม non-lethal ได้แก่ เมือก ครีบ และเหงือก หลังจาก 14 วันที่ฉีดเชื้อไวรัส IHNV ในตัวอย่าง พบว่า มี CPE เกิดขึ้นในเซลล์ไลน์ที่เลี้ยงไว้ จึงได้นำมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างไตและม้ามที่เป็นตัวอย่างกลุ่ม lethal พบว่า ครีบจะมีความไวในการตรวจพบไวรัสมากกว่าไตและม้าม ดังนั้นครีบจึงเป็นตัวอย่างที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้ง่ายที่สุด

Charoenwai et al. (2019) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเกล็ดหลุดในปลากะพงขาวด้วยเทคนิค semi-nested PCR พบว่า วิธีดังกล่าวที่พัฒนาขึ้นมาในครั้งนี้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้อย่างมีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส SDDV เท่านั้น โดยใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียก่อโรค 10 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus iniae*, *V. harveyi*, *V. parahemolyticus XN89*, *V. vulnificus*, *V. tubiashi*, *V. Cholera*, *T.litopenaei*, *Nocardia seriolae*, *V. alginolyticus*, *Pleisiomas shigelloides* และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ ISKNV และ NNV และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV ปริมาณน้อยที่สุด 100 copies/μL ซึ่งประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ชุดสกัด A, B และวิธีการสกัดที่นิยมใช้ทั่วไป (phenol-chloroform) มีผลต่อความไวในการตรวจพบไวรัสลดลง จากนั้นได้นำวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นสุ่มตรวจตัวอย่างปลากะพงขาวและปลาเก๋าของประเทศไทยทางภาคตะวันออก

และภาคใต้ จากการสุ่มตรวจตัวอย่างจากอวัยวะตับและไต ปลากะพงขาวจำนวน 192 ตัวอย่าง ปลาเก๋าจำนวน 45 ตัวอย่าง พบว่า มีการตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV ในปลากะพงขาวจังหวัดจันทบุรีทั้งหมด 31 ตัวอย่าง

Dangtip et al. (2019) ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโดยวัดความเข้มสีของโรคเกล็ดหลุดในปลากะพงขาว ด้วยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) กับ xylenol orange พบว่า มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสสูงกว่า semi-nested PCR อีกทั้งยังมีวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่รวดเร็ว คือ G3T เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ พบว่า ความเข้มข้นดีเอ็นเอปริมาณน้อยเพียง 100 pg ก็สามารถตรวจพบไวรัสได้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ สะดวก และง่ายต่อการใช้งาน เกษตรกรสามารถนำไปใช้ตรวจโรคหน้าฟาร์มได้

de Groof et al. (2015) ได้ทำการศึกษาเชื้อไวรัส SDDV ที่ก่อโรคเกล็ดหลุดในปลากะพงขาวจากฟาร์มประเทศสิงคโปร์และประเทศอินโดนีเซีย โดยใช้หลักการ Koch' s postulates เข้ามาช่วยในการศึกษา ซึ่งตัวอย่างที่เก็บมามีลักษณะอาการเบื้องต้นคล้ายกับโรคไวรัส SDDV จึงได้แยกเชื้อไวรัสออกมาจากน้ำเลือด แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย VIDISCA-454 โดยใช้เทคนิค real time qPCR เพื่อหาลำดับเบส พบว่าเป็นไวรัสชนิดเดียวกัน จากนั้นนำมาฉีดในเซลล์ไลน์ SK21 หลังจาก 6 วัน เกิดการติดเชื้อไวรัสจะมีลักษณะของ Cytopathogenic effect (CPE) เกิดขึ้นในเซลล์ จึงมีการยืนยันเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค qPCR อีกครั้ง และเมื่อนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า ไวรัสมีลักษณะเป็นรูปทรงหกเหลี่ยม (Hexagonal) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 140 นาโนเมตร จากนั้นนำเชื้อไวรัสมาฉีดเข้าไปในใต้ท้องของปลากะพงขาว เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน ปลากะพงขาวก็มีลักษณะอาการเกล็ดหลุด ครีบกร่อน ลำตัวดำ ซึ่งมีลักษณะอาการเหมือนกัน แสดงว่าเป็นเชื้อไวรัส SDDV จากนั้นจึงได้ทำการคิดค้นวิธีการป้องกันโรคไวรัส SDDV ด้วยการผลิตวัคซีน 3 ชนิด เมื่อนำมาฉีดในเซลล์ไลน์ที่ติดเชื้อไวรัส พบว่า formalin-inactivated virus (FK-SDDV) สามารถป้องกันการเกิดโรคไวรัส SDDV ได้ 74%, Binary ethyleneimine-inactivated virus (BEI-SDDV) 70% และ recombinant MCP protein (recMCP) สามารถป้องกันการเกิดโรคไวรัส SDDV ได้มากที่สุด คือ 91%

Ferreira, Costa, Macchia, Dawn Thompson, and Baptista (2019) ได้ทำการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Betanodavirus ในปลา European seabass โดยใช้ตัวอย่างในกลุ่ม non-lethal ได้ทำการฉีดเชื้อเข้าช่องท้องและแช่ ที่ 10^7 $TCID_{50}$/mL และ 10^6 $TCID_{50}$/mL ตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่างสมอง เหงือก ครีบ และเลือดที่ 7, 15 และ 30 วัน เมื่อนำมาตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ไวรัสในตัวอย่างกลุ่ม non-lethal ไม่แน่นอน ซึ่งจะมีจำนวนไวรัสน้อยกว่าไวรัสในสมอง สำหรับเลือดมี

จำนวนไวรัสสูงกว่าในการทดลองแบบฉีดเชื้อเข้าช่องท้องที่ 15 dpi และใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดี พบแอนติบอดีที่ 7 dpi และมีค่า antibody titres สูง ที่ 15 และ 30 dpi ดังนั้นในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะจึงเป็นการประเมินการติดเชื้อในระยะแรกได้

Gibson-Kueh et al. (2012) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส SDDV ในปลากะพงขาว มีการนำเนื้อเยื่อของปลากะพงขาวที่ติดโรค SDDV ซึ่งลักษณะภายนอกจะมีผิวบริเวณลำตัวมีสีดำ เกล็ดหลุด และครีบกร่อน และอวัยวะภายในบริเวณตับมีเส้นไขมันแทรกอยู่ โดยใช้วิธี Histopathology พบว่า มีกล้ามเนื้อตายบริเวณผิวหนัง เกิดการอักเสบของหลอดเลือดแดง ทำให้ไม่สามารถส่งเลือดไหลเวียนไปที่ไตได้ และมีกล้ามเนื้อตายรุนแรงมากขึ้น ดังนั้นจึงมีการนำไวรัส SDDV ไปศึกษาโดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) พบว่า ไวรัสมีลักษณะเป็นรูปทรงหกเหลี่ยม (Hexagonal) ซึ่งไวรัสที่พบในม้ามจะมีเยื่อหุ้มขนาดใหญ่ประมาณ 188-269 นาโนเมตร และไวรัสที่พบในตับจะมีเยื่อหุ้มขนาดเล็กกว่าในม้าม ประมาณ 133 นาโนเมตร

Leis et al. (2018) ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรค Largemouth Bass Virus (LMBV) ของปลากะพงปากกว้างในแม่น้ำมิสซิสซิปปี ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยทำการเปรียบเทียบตัวอย่างในกลุ่ม lethal และ non-lethal ด้วยเทคนิค PCR และ qPCR พบว่า สามารถแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างปลาได้เพียง 30% เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในเซลล์ bluegill fry (BF-2) โดยใช้เทคนิคดั้งเดิม ซึ่งพบไวรัสในตัวอย่างเมือก ไต และม้ามไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อนำมาตรวจด้วยใช้วิธีป้ายเมือกออกมาตรวจพบว่า มีความไวในการตรวจพบไวรัสมากกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบดั้งเดิม 70% ดังนั้น ตัวอย่างในกลุ่ม non-lethal สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรค LMBV ได้

Liamnimitr, Thammatorn, U-thoomporn, Tattiyapong, and Surachetpong (2018) ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรค Tilapia Lake Virus (TILV) ในตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลา (non-lethal) โดยใช้เทคนิค RT-PCR และการเลี้ยงเซลล์ พบว่า มีการตรวจพบโรค TILV ในตัวอย่างตับและเมือกจากปลานิลที่กำลังจะตาย และสามารถแยกไวรัสได้โดยการเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบการตรวจพบไวรัสในตับและเมือก พบว่า เมือกสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคนี้ และไวรัสที่อยู่ในเมือกยังคงมีชีวิตอยู่ทำให้เกิด cytopathic effect ในเซลล์ E-11 ได้ ซึ่งเมื่อนำไวรัส TILV มาฉีดกลับในปลาปกติ จะมีอัตราการตาย 55.71% ทำให้เกิดการถ่ายทอดแบบ horizontal ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการแพร่กระจายของโรค TILV อีกทั้งยังลดการทำลายปลา เนื่องจากสามารถนำเมือกมาตรวจวินิจฉัยโรคได้

Nurliyana et al. (2020) ได้ทำศึกษาโรคที่ไม่ทราบสาเหตุในฟาร์มปลากะพงขาวที่ประเทศมาเลเซีย เมื่อเดือนกันยายน 2019 ที่ทำให้ปลากะพงขาวตัวเต็มวัยตาย ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโรค

เกล็ดหลุด ได้แก่ ตัวดำ เกล็ดหลุดออกง่าย ท้องแดง และว่ายบนผิวน้ำ จากผลการศึกษาพยาธิสภาพของโรค พบว่า มีความผิดปกติที่หลายอวัยวะในอวัยวะภายใน รวมถึงมีกล้ามเนื้อตายที่ท่อไต ตกเลือดในม้ามและสมอง และมีการอักเสบของเซลล์ต่อมน้ำเหลือง พบว่ามี inclusion bodies ในไซโตพลาสซึม ในเซลล์ตับ ซึ่งบ่งบอกว่ามีการติดเชื้อไวรัส เมื่อทำการศึกษาด้วย TEM พบว่ามีอนุภาคของไวรัสในเซลล์ และเมื่อตรวจวินิจฉัยด้วย PCR พบว่า ปลาที่มีลักษณะอาการดังกล่าวติดเชื้อ SDDV จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรมพบว่า SDDV ของมาเลเซียมีความเหมือนกับสิงคโปร์ และไทย 99.20%

Richards, Murphy, Brenden, Loch, and Faisal (2017) ได้ทำการศึกษาการตรวจวินิจฉัยโรค Bacterial kidney disease (BKD) มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Renibacterium salmoninarum* ในปลาแซลมอนชินูก โดยทำการแช่และฉีดเชื้อกลับ จากนั้นนำตัวอย่างทั้งในกลุ่ม lethal และ non-lethal มาตรวจด้วยเทคนิค nPCR และ ELISA เพื่อหาความไวของเชื้อ พบว่า หลังจาก 9 วัน ปลาจะมีลักษณะอาการตกเลือดบริเวณลำตัว เหงือกสีซีดอย่างรุนแรง เกิดการอักเสบเรื้อรังบริเวณม้ามและไต และมีเยื่อปกคลุมบริเวณตับ ซึ่งจะไม่สามารถพบลักษณะอาการดังกล่าวในกลุ่มควบคุม สำหรับการฉีดเชื้อเป็นวิธีที่ดีสุด เนื่องจากพบว่ามีการติดเชื้อ 100% ของตัวอย่างในกลุ่ม lethal และ non-lethal เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง uro-fecal เลือด และเมือก พบว่ามีการติดเชื้อ 97, 84 และ 52% ตามลำดับ สำหรับการแช่เชื้อ ตัวอย่างในกลุ่ม lethal, non-lethal, uro-fecal, blood และ mucous พบว่ามีการติดเชื้อ 69, 27, 19, 3 และ 6% ตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษาสามารถนำตัวอย่างในกลุ่ม non-lethal มาใช้ติดตามการเกิดโรค BKD ได้

Senapin et al. (2019) ได้ทำการศึกษาการตายของปลากะพงขาวจากโรคเกล็ดหลุดที่เกิดจากเชื้อไวรัส (SDDV) ในภาคตะวันออกของไทย จากการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพ พบว่า มีกล้ามเนื้อตายบริเวณม้าม นิวเคลียสบีบตัวแน่นและแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ ในเนื้อเยื่อตับ และไต อีกทั้งยังเกิดการอักเสบในหลายอวัยวะ เหมือนกับการรายงานครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ เมื่อนำไวรัสมาแยกให้มีความบริสุทธิ์ด้วยวิธี sucrose gradient ultracentrifugation พบว่า ความหนาแน่นของชั้นไวรัสจะอยู่ที่ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM) พบว่า อนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นรูปทรงหกเหลี่ยม มีเปลือก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100-180 นาโนเมตร จากนั้นทำการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR เพื่อยืนยันว่าเป็นไวรัส SDDV

Sriisan et al. (2020) ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเกล็ดหลุด ด้วยเทคนิค qPCR ซึ่งสามารถตรวจพบปริมาณไวรัสได้น้อยที่สุด 2 copies/reaction โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ ATPase ของ SDDV ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจพบไวรัสได้สูงมาก

และสามารถนำไปใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสในปลาป่วยที่ไม่แสดงอาการ เพื่อเป็นการติดตามสุขภาพปลา และป้องกันการแพร่กระจายของไวรัส

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 Animal ethic

การใช้สัตว์ในการศึกษานี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (IACUC001/2563)

3.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างปลากะพงขาว ฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว ปากแม่น้ำแหลมสิงห์ อำเภอแหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ปลากะพงขาวที่มีอาการป่วยในกระชัง จำนวน 15 ตัว กลุ่มที่ 2 ปลากะพงขาวที่ไม่แสดงอาการในกระชังเดียวกัน จำนวน 5 ตัว และฟาร์ม 2 ปลากะพงขาวปกติจากบริเวณหมู่บ้านอัมพวา อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (Reference site) จำนวน 5 ตัว ดังภาพที่ 15

ภาพที่ 15 แผนที่เก็บตัวอย่างปลากะพงขาวในจังหวัดจันทุบรี ฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว อำเภอแหลมสิงห์ และฟาร์ม 2 บ่อดินหมู่บ้านอัมพวา อำเภอท่าใหม่

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL

3.3.2 PCR tube ขนาด 0.2 mL

3.3.3 Auto pipette ขนาด 1,000, 200, 10 µL

3.3.4 Pipette tips

3.3.5 ขวดใส่สาร

3.3.6 กระบอกตวง

3.3.7 แท่งบดเนื้อเยื่อ

3.3.8 ไมโครเวฟ (Microwave)

3.3.9 เครื่องชั่งสาร

3.3.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

3.3.11 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex)

3.3.12 Heating block

3.3.13 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (T100™ Thermal Cycler, BIO-RAD)

3.3.14 เครื่องแยกขนาด DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)

3.3.15 เครื่องถ่ายรูปเจล (Gel Documentation)

3.3.16 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer)

3.3.17 เข็มขนาด 21G พร้อม syringe 3 mL

3.3.18 แผ่นปิดสไลด์

3.3.19 อุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ กรรไกร ด้ามมีด ใบมีด และที่คีบ

3.3.20 ขวดเก็บน้ำ

3.3.21 เครื่องวัดความเค็ม (pH meter)

3.3.22 DO meter

3.3.23 กระบอกเก็บน้ำแนวนอน

3.3.24 ถาดสำหรับผ่าตัวอย่างปลา

3.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1 สารเคมีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

3.4.1.1 Clove oil 80 ppm

3.4.1.2 Heparin tubes

3.4.1.3 95% ethanol

3.4.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

3.4.2.1 TF-lysis buffer

3.4.2.2 Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol

3.4.2.3 Absolute ethanol

3.4.2.4 70% ethanol

3.4.2.5 TE buffer

3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

3.4.3.1 Primer Forward

3.4.3.2 Primer Reverse

3.4.3.3 10X reaction buffer

3.4.3.4 10 mM dNTPs

3.4.3.5 5U/µL *Taq* DNA polymerase

3.4.3.6 Sterile distilled water

3.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลโดย Gel electrophoresis

3.4.4.1 Agarose gel

3.4.4.2 SERVA green (Nucleic acid staining solution)

3.4.4.3 1X Tris-boric-EDTA buffer (TBE)

3.4.4.4 6X loading dye

3.4.4.5 100 bp DNA ladder

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 วิธีการเก็บตัวอย่าง

1) ทำการสลบตัวอย่างปลากะพงขาวด้วยน้ำมันกานพลู (clove oil) ความเข้มข้น 80 ppm (Bambang Hanggono, 2006) ปลากะพงขาวจะสลบอยู่ในขั้น deep anesthesia

2) เจาะเลือดที่เส้นเลือด caudal vein บริเวณโคนหาง โดยใช้เข็มขนาด 21G พร้อม syringe 3 mL ใส่ลงหลอด heparin ที่เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วเก็บไว้อุณหภูมิ 4 °C

3) ขูดเมือกบริเวณผิวหนัง โดยใช้แผ่นปิดสไลด์ลากลงไปตามแนวของเกล็ดปลา แล้วนำเมือกใส่ลงใน 1.5 mL microcentrifuge tube

4) ทำการผ่าตัดตัวอย่างปลา ด้วยวิธี aseptic technique โดยใช้กรรไกร ด้ามมีด และที่คีม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งทำการผ่าเปิดช่องท้อง แล้วตัดเนื้อเยื่อตับ ไต ม้าม กล้ามเนื้อ จากนั้นตัดครีบหาง สมอง และตา โดยไม่เอาตาขาว ประมาณ 30 mg เก็บไว้ใน 95% Ethanol จากนั้นตัดเหงือกทั้ง 8 ซี่ เก็บใส่ใน 0.85% NaCl เพื่อนำไปตรวจหาปรสิตภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

5) ทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนัง และอวัยวะภายในต่าง ๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+1.5% NaCl เพื่อดูการติดเชื้อร่วมกัน เนื่องจากเป็นปลาที่เก็บตามธรรมชาติ

6) เก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในระบบเลี้ยงที่อาจเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ หอยเจดีย์ และหอยนางรม อย่างละ 10 ตัว ซึ่งจะเกาะติดอยู่บนเสาไม้ไผ่ของกระชังเลี้ยงปลาตามธรรมชาติ และเหยื่อปลาสดที่บดละเอียด โดยใช้มือจับและนำไปน็อคด้วยน้ำแข็ง จากนั้นใช้มีดแกะเปลือกหอย แล้วนำตัวหอยมาสกัด DNA

7) ศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อม โดยทำการวัดอุณหภูมิน้ำ ค่า pH และ DO. จากนั้นเก็บน้ำ 4 จุด บริเวณกระชัง โดยใช้กระบอกเก็บน้ำแนวนอน จากนั้นนำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตรท์ ไนเตรท และฟอสเฟต (Parsons, Maita, & Lalli, 1984) ดังภาคผนวก ก.

3.5.2 การสกัด DNA

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อปลากะพงขาว ได้แก่ ตับ ไต ม้าม เหงือก ครีบหาง ตา สมอง และกล้ามเนื้อ มาสกัด DNA โดยใช้ Phenol-chloroform ส่วนเลือด และเมือก สกัด DNA โดยใช้ High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche จากนั้นนำมาเช็คคุณภาพ DNA ควรอยู่ในช่วง 1.7-1.8 วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 nm. และ 280 nm. โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดแล้วมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 ng/μL เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยโรคต่อไป

3.5.3 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดด้วยวิธี Semi-nested PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 100 ng/μL โดยเตรียมส่วนผสมและขั้นตอนในการทำปฏิกิริยา semi-nested PCR ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขั้นที่ 1 (1^{st} step PCR)

Component	volume/reaction (μL)
10 μM RB ATPase F1	0.50
10 μM RB ATPase R1	0.50
10X reaction buffer	2.50
10 mM dNTPs	0.50
5 U/μL RBC *taq* DNA polymerase (RBC bioscience, Taiwan)	0.25
DNA template (100 ng/μL)	2.00
Total	25.0

ตารางที่ 2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ขั้นที่ 1 (1^{st} step PCR)

Step	T (°C)	Time	Cycle
Pre-Denaturation	94°C	5 min	
Denaturation	94°C	30 sec	
Annealing	60°C	30 sec	30 Cycles
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	5 min	

นำ PCR product ที่ได้ในปฏิกิริยาขั้นที่ 1 มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อในขั้นที่ 2 (semi-nested PCR) ดังตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสขั้นที่ 2 (semi-nested PCR)

Component	volume/reaction (µL)
10 µM RB ATPase F1	0.40
10 µM RB ATPase R2	0.40
10X reaction buffer	2.00
10 mM dNTPs	0.40
5 U/µL RBC *taq* DNA polymerase (RBC bioscience, Taiwan)	0.20
1^{st} step PCR product	5.00
Total	20.0

ตารางที่ 4 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ขั้นที่ 2 (semi-nested PCR)

Step	T (°C)	Time	Cycle
Pre-Denaturation	94°C	5 min	
Denaturation	94°C	30 sec	
Annealing	67°C	30 sec	30 Cycles
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	5 min	

3.5.4 การวิเคราะห์ผล PCR product โดยใช้เทคนิค Gel Electrophoresis

เตรียม 1.2% Agarose gel โดยชั่ง Agarose gel 0.96 กรัม ละลายใน 1X TBE buffer 80 mL หลอมเหลว Agarose ด้วยไมโครเวฟหลอมเหลวละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม SERVA Green (Nucleic acid staining solution) 1.5 µL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เทใส่ใน sample comb ที่เตรียมไว้ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ Agarose gel แข็งตัว จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 10 µL ผสมกับ 6X loading dye 2 µL ใส่ลงบนช่องใน agarose gel ที่เตรียมไว้ จากนั้นใส่ 100 bp DNA lader ไว้ที่ช่องแรกและช่องสุดท้าย แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย 1X TBE buffer ใช้เวลาประมาณ 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ที่ผ่านการแยกขนาดดีเอ็นเอแล้วไปถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel Documentation ภายใต้แสง UV

3.5.5 การหาปริมาณไวรัส SDDV ในตัวอย่างกลุ่ม non-lethal ด้วยเทคนิค Quantitative PCR

นำดีเอ็นเอเลือด เมือก และครีบหางที่ได้จากการศึกษาข้างต้นไปวิเคราะห์หาปริมาณของไวรัส SDDV ด้วยเทคนิค qPCR ตามวิธีการของ Sriisan et al. (2020) เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของไวรัสจากตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการตรวจไวรัสจากตัวอย่างเหล่านี้

3.5.6 การตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ด้วยเทคนิค PCR

เนื่องจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างเป็นบริเวณปากแม่น้ำ ทำให้มีกระแสน้ำไหลผ่านตลอดเวลา จึงจำเป็นต้องมีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ร่วมด้วย ซึ่งอาจจะมีการติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค

Diseases	Primer	Sequences (5' to 3')	PCR amplicons (bp)	Ref.
Vibrio vulnificus	1. vvhA type I	F: AGATTAAGTGTGTGTTGCACAAGCGGTG R: ACCGAAAACAGCGCTGAAGGAAGAACGGTA	813	Senoh et al. (2005)
Vibrio harveyi	2. ToxR	F: GAAGCAGCACTCACCGAT R: GGTGAAGACTCATCAGCA	382	Pang et al. (2006)
	3. VH-HP	F: GGCGAACCTATAACGATAAGC R: GGCTCCAAGTGGTTTTACACT	445	Centex shrimp unpublished
Flavobacteriaceae	4. 16S rRNA	20F: AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG R1438: GCCCTAGTTACCAGTTTTAC	1450	Darwish and Ismaiel (2005)
Tenacibaculum maritimum	5. MAR	MAR1: AATGGCATCGTTTTAAA MAR2: CGCTCTCTGTTGCCAGA	1078	Toyama et al. (1996)
Streptococcus iniae	6. Sin	F: CTAGAGTACACATGTACT(AGCT)AAG R: GGATTTTCCACTCCCATTAC	300	Zlotkin et al. (1998)
Scale drop disease virus (SDDV)	8. ATPase	F1: ATGTCTGTTCCTGTGAAGGAA R1: CGCAATTGCTGTTGTTGAATAA R2: ACGGTAGACATTGGAACTTGT	412, 738	Charoenwai et al. (2019)
Nervous necrosis virus (NNV)	9. VNN	F1: ACACTGGAGTTTGAAATTCA R1: GTCTTGTTGAAGTTGTCCCA F2: ATTGTGCCCCGCAAACAC R2: GACACGTTGACCACATCAGT	255, 605	Dalla Valle et al. (2000)

3.5.7 วิธีการติดตามสุขภาพปลากะพงขาว โดยใช้ตัวอย่างเลือดในการตรวจหาเชื้อไวรัส SDDV (recommended protocol)

นำพ่อแม่พันธุ์หรือปลากะพงขาวในระหว่างการเลี้ยงมาวางยาสลบด้วยน้ำมันกานพลู 80 ppm จากนั้นทำการดูดเลือดมาจำนวน 200 µL ใส่ในหลอด heparin ที่เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำเลือดมาเก็บไว้ที่ 4 °C ปลาที่นำมาตรวจสุขภาพแล้วสามารถปล่อยลงบ่อได้เลย จากนั้นนำตัวอย่างเลือดมาสกัด DNA แล้วตรวจหาเชื้อ SDDV ด้วยเทคนิค Semi-nested PCR หรือ qPCR (ภาพที่ 16)

ภาพที่ 16 วิธีการตรวจสุขภาพปลากะพงขาว โดยใช้ตัวอย่างเลือด

3.5.8 แผนงานวิจัย

แนวทางการศึกษาวิจัย ใช้ระยะเวลาในการศึกษา 1 ปี 6 เดือน ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แผนการดำเนินงานวิจัย

แผนงานวิจัย	เดือนที่																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. เก็บตัวอย่างปลากะพงขาว	/										/	/		/				
- เก็บตัวอย่างน้ำ ปลาเหยื่อ หอยนางรม หอยเจดีย์ - เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย	/ /										/	/						
2. นำตัวอย่างที่ได้มาสกัด DNA	/	/									/	/		/	/			
3. ตรวจวินิจัยโรค SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และโรคชนิดอื่น	/	/	/	/	/	/					/	/		/	/	/		
4. ตรวจวัดคุณภาพน้ำ	/	/																
5. อภิปรายผล							/	/	/	/	/	/	/			/	/	/
6. จัดทำรูปเล่มสมบูรณ์									/	/	/	/				/	/	/

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากตัวอย่างที่ต้องทำลายปลาและไม่ต้องทำลายปลา

จากการเก็บตัวอย่างปลากะพงขาวในจังหวัดจันทบุรีช่วงที่มีการระบาด ฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว อ.แหลมสิงห์ เป็นปลาป่วย (n=15) น้ำหนักเฉลี่ย 0.15 ± 0.06 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 21.68 ± 3.45 เซนติเมตร และปลาปกติไม่แสดงอาการ (n=5) น้ำหนักเฉลี่ย 0.21 ± 0.07 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 23.4 ± 3.20 เซนติเมตร และฟาร์ม 2 บ่อดินหมู่บ้านอัมพวา อ.ท่าใหม่ เป็นปลาปกติ (n=5) น้ำหนักเฉลี่ย 0.87 ± 0.05 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 30.5 ± 0.60 เซนติเมตร (ภาพที่ 17)

ภาพที่ 17 ตัวอย่างปลากะพงขาวจากฟาร์ม 1 A) ปลาป่วย B) ปลาปกติไม่แสดงอาการ และฟาร์ม 2 C) ปลาปกติ

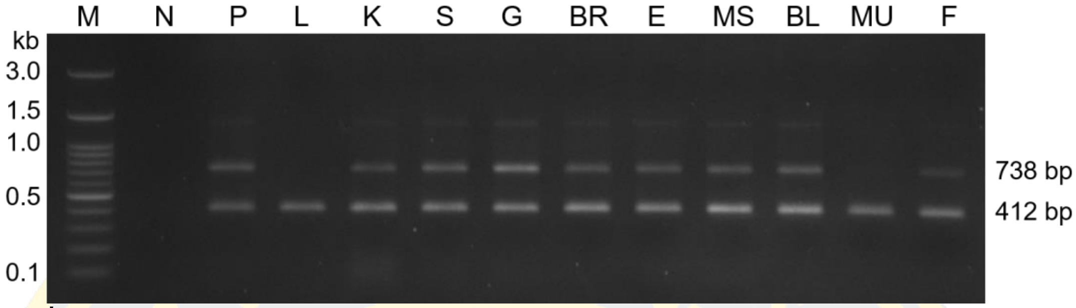
จากการตรวจหาเชื้อไวรัส SDDV จากตัวอย่างที่ต้องทำลายปลาและไม่ต้องทำลายปลาในช่วงเวลาที่มีการระบาด ด้วยเทคนิค semi-nested PCR โดยตรวจหายีน ATPase ของไวรัส SDDV ซึ่งมีขนาด 412 และ 738 bp พบว่าไวรัส SDDV สามารถติดในทุกอวัยวะของปลาป่วยและปลาปกติที่ไม่แสดงอาการจากฟาร์ม 1 ปลาป่วย (n=15) ตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV ในตัวอย่างที่ทำลายปลา ได้แก่ ตับ คิดเป็น 86.7% (95% CI: 58.4-97.7) ตา คิดเป็น 73.3% (95% CI: 44.8-91.1) ม้าม สมอง และกล้ามเนื้อ คิดเป็น 93.3% (95% CI: 66.0-99.6) และไต และเหงือก คิดเป็น 100% (95% CI: 74.7-99.4) สำหรับตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา ได้แก่ ครีบหาง คิดเป็น 73.3% (95% CI: 44.8-91.1) เลือด และเมือก คิดเป็น 100% (95% CI: 69.9-99.2, 56.1-98.7) ส่วนปลาปกติที่ไม่แสดงอาการ (n=5) ตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV ทั้งในตัวอย่างที่ทำลายปลา ได้แก่ ตับ ไต ม้าม เหงือก สมอง คิดเป็น 60% (95% CI: 17.1-92.7) ตา คิดเป็น 20% (95% CI: 1.1-70.1) และกล้ามเนื้อ คิดเป็น 100% (95% CI: 46.3-98.1) สำหรับตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา ได้แก่ ครีบหาง คิดเป็น 80% (95% CI: 29.9-98.9) เลือดและเมือก คิดเป็น 100% (95% CI: 39.6-97.6) เช่นเดียวกัน ส่วนปลาปกติ (n=5) จากฟาร์ม 2 ไม่พบการติดเชื้อไวรัส SDDV ในทุกอวัยวะ ดังตารางที่ 7 ผลตัวอย่างของการตรวจเชื้อไวรัส SDDV ในอวัยวะต่างๆ ของตัวแทนปลาป่วยตัวที่ 13 ทั้งตัวอย่างในกลุ่มที่ทำลายปลา ได้แก่ ตับ ไต ม้าม เหงือก สมอง ตา และกล้ามเนื้อ และตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา ได้แก่ เลือด เมือก และครีบหาง ได้แสดงดังภาพที่ 18 ซึ่งจะเห็นความเข้มของแบน ATPase 1 แบน 412 bp, 2 แบน 412 และ 738 bp ที่แตกต่างกันนี้ เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน แสดงให้เห็นถึงระดับการติดเชื้อไวรัส SDDV แบบ light infection (+) และ heavy infection (++) ตามลำดับ ในแต่ละอวัยวะของปลา

จากตารางที่ 8 ผลการตรวจหาปริมาณไวรัส SDDV จากตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลาด้วยเทคนิค qPCR พบปริมาณไวรัส SDDVในเลือด เท่ากับ $1.52 \times 10^{4} \pm 0.13 \times 10^{4}$ copies/μL เมือก เท่ากับ $2.92 \times 10^{4} \pm 1.44 \times 10^{4}$ copies/μL และ ครีบหาง เท่ากับ $4.56 \times 10^{4} \pm 6.38 \times 10^{4}$ copies/μL จากปลาป่วย สำหรับปลาปกติที่ไม่แสดงอาการ มีปริมาณไวรัสในเลือด เท่ากับ 52.64 ± 51.91 copies/μL เมือก เท่ากับ 119.95 ± 159.88 copies/μL และ ครีบหาง เท่ากับ $1.32 \times 10^{3} \pm 1.86 \times 10^{3}$ copies/μL แสดงให้เห็นว่าฟาร์มที่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV สามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งในปลาป่วยและปลาปกติที่ไม่แสดงอาการ ทั้งนี้ตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลามีความไวและเหมาะสมที่จะสามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อไวรัส SDDV ได้

ตารางที่ 7 ผลการตรวจเชื้อไวรัส SDDV ในตัวอย่างที่ทำลายปลาและไม่ทำลายปลาจากปลาป่วยและปลาปกติที่เก็บมาจาก 2 ฟาร์ม

Fish no.	**Lethal sampling**							**Non-lethal sampling**		
	L	**K**	**S**	**G**	**BR**	**E**	**MS**	**BL**	**MU**	**F**
Farm 1 (affected farm)										
Clinically sick fish										
1	++	++	++	++	++	-	++	++	ND	-
2	++	++	++	++	++	++	++	++	ND	-
3	++	++	++	++	++	++	++	++	ND	-
4	++	++	++	++	++	++	++	++	ND	+
5	++	++	++	++	++	+	++	++	ND	++
6	++	++	++	++	++	-	++	++	ND	++
7	++	++	++	++	++	+	++	++	ND	++
8	++	++	++	++	++	-	++	ND	ND	++
9	-	+	-	+	-	+	-	++	++	+
10	+	+	+	++	+	-	+	++	+	-
11	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++
12	+	++	++	++	+	++	+	ND	+	++
13	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
14	-	++	++	++	++	++	++	ND	+	++
15	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
Total	13/15	15/15	14/15	15/15	14/15	11/15	14/15	12/12	7/7	11/15
%P	86.7	100	93.3	100	93.3	73.3	93.3	100	100	73.3
95%CI	58.4-97.7	74.7-99.4	66.0-99.6	74.7-99.4	66.0-99.6	44.8-91.1	66.0-99.6	69.9-99.2	56.1-98.7	44.8-91.1
Clinically healthy fish										
16	+	+	+	++	++	-	+	+	+	++
17	+	+	++	++	++	+	+	++	ND	+
18	+	-	+	-	-	-	+	ND	+	+
19	-	+	-	-	++	-	+	+	+	+
20	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
Total	3/5	3/5	3/5	3/5	3/5	1/5	5/5	4/4	4/4	4/5
%P	60	60	60	60	60	20	100	100	100	80
95%CI	17.1-92.7	17.1-92.7	17.1-92.7	17.1-92.7	17.1-92.7	1.1-70.1	46.3-98.1	39.6-97.6	39.6-97.6	29.9-98.9
Farm 2 (non-affected farm)										
21-25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
%P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95%CI	1.9-53.7	1.9-53.7	1.9-53.7	1.9-53.7	1.9-53.7	1.9-53.7	1.9-53.7	1.9-53.7	1.9-53.7	1.9-53.7

ND, not done; -, negative; ++, heavy infection; +, light infection; L, liver; K, kidney; S, spleen; G, gill; BR, brain; E, eye; MS, Muscle, BL, blood; MU, mucus; F, caudal fin. %P, Prevalence; 95% CI, confidence interval.



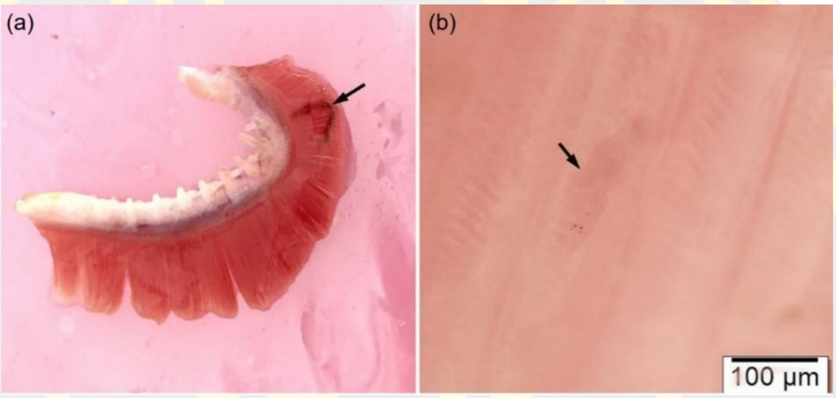
ภาพที่ 18 แสดงผลการตรวจยีน ATPase ของไวรัส SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR ซึ่งมีขนาดยีน 412 และ 738 bp ในอวัยวะต่างๆของปลาป่วยตัวที่ 13 ได้แก่ ตับ (L, Liver) ไต (K, Kidney) ม้าม (S, Spleen) เหงือก (G, Gill) สมอง (BR, Brain) ตา (E, Eye) กล้ามเนื้อ (MS, Muscle) เลือด (BL, Blood) เมือก (MU, Mucus) และครีบหาง (F, Caudal fin) M คือ 100 bp DNA ladder; N คือ ตัวควบคุมลบ (Negative control); P คือ ตัวควบคุมบวก (Positive control)

ตารางที่ 8 ปริมาณไวรัส SDDV จากตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลา ด้วยเทคนิค qPCR

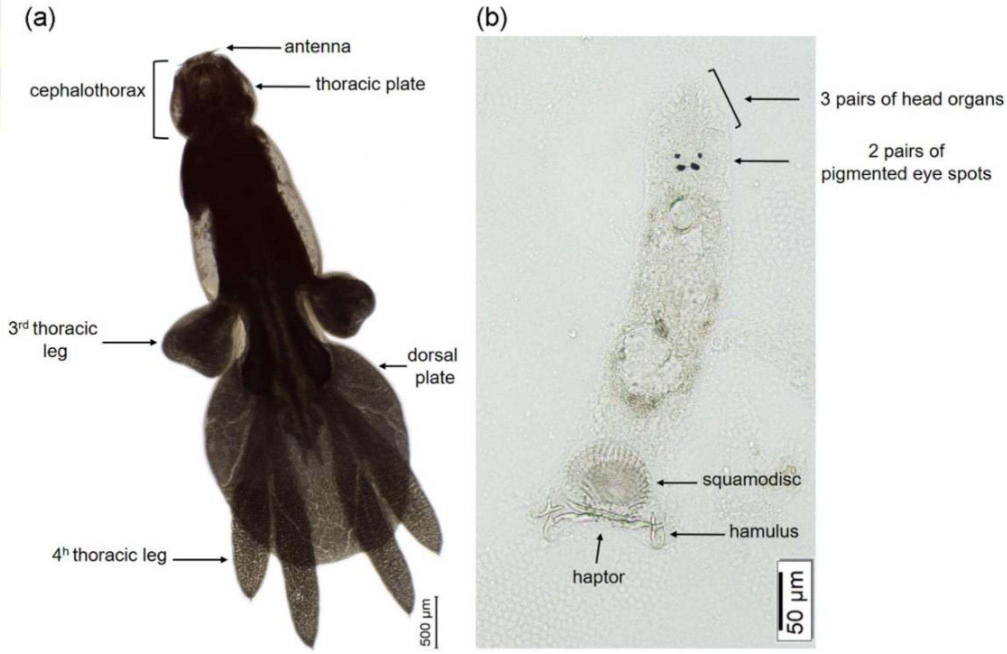
Fish no.	**Viral load of non-lethal samples (copies/200 ng)**		
	Blood	**Mucus**	**Caudal fin**
Farm 1 (affected farm)			
Clinically sick fish			
9	$1.61x10^4$	$1.91x10^4$	$4.1x10^2$
11	$1.43x10^4$	$3.94x10^4$	$9.07x10^4$
Total	$1.52x10^4 \pm 0.13x10^4$	$2.92x10^4 \pm 1.44x10^4$	$4.56x10^4 \pm 6.38x10^4$
Clinically healthy fish			
16	89.35	$2.33x10^2$	$2.63x10^3$
20	15.94	6.9	1.61
Total	52.64 ± 51.91	119.95 ± 159.88	$1.32x10^3 \pm 1.86x10^3$

4.2 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากตัวอย่างปรสิตภายนอก

จากการศึกษาปรสิตภายนอกในเหงือกปลากะพงขาว พบปรสิต 2 ชนิด ได้แก่ โคพีพอด *Lernanthropus* sp. สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีขนาดประมาณ 5-6 มิลลิเมตร (ภาพที่ 19a) เพศเมียจะมี dorsal plate ที่มีลักษณะคล้ายกระโปรง ดังภาพที่ 20a ซึ่งไม่มีสายไข่ (egg-strings) และปลิงใส *Diplectanum* sp. มีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 19b) ลักษณะของปลิงใสประกอบด้วยจุดตา 2 คู่ มีอวัยวะส่วนหัว 3 คู่ มี hamulus และ haptor ไว้เกาะกับซี่เหงือก และ squamodisc ที่มีลักษณะคล้ายก้นหอย (ภาพที่ 20b)

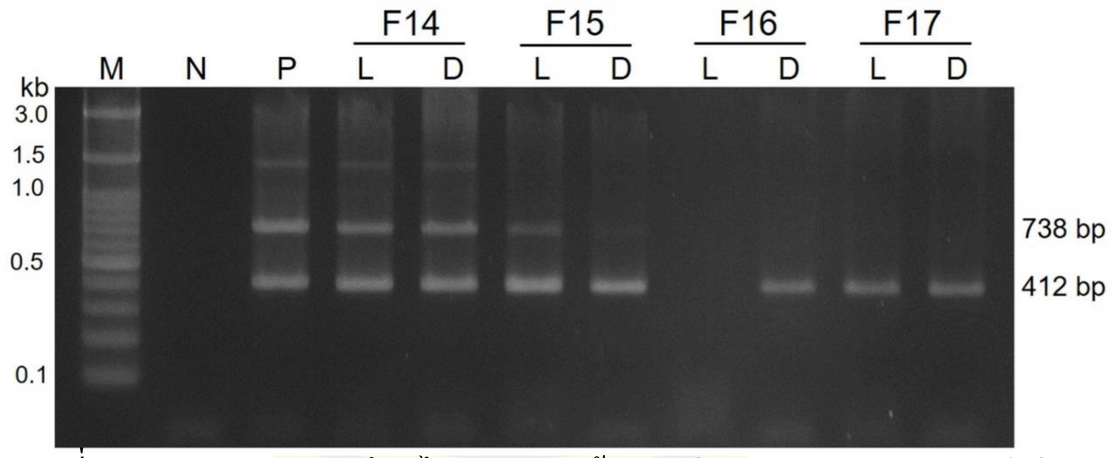


ภาพที่ 19 การเข้าเกาะของปรสิต *Lernanthropus* sp. (a) และ *Diplectanum* sp. (b) บริเวณซี่เหงือก (gill filaments) ของปลากะพงขาว



ภาพที่ 20 ลักษณะของโคพีพอด *Lernanthropus* sp. (a) และปลิงใส *Diplectanum* sp. (b) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาเชื้อไวรัส SDDV จากปรสิตภายนอกในเหงือกปลา จากตารางที่ 9 ฟาร์ม 1 พบโคพีพอด *Lernanthropus* sp. และปลิงใส *Diplectanum* sp. จำนวน 5 ± 4.3 ตัว และ 154 ± 165.6 ตัว ตามลำดับ มีการติดเชื้อไวรัส SDDV คิดเป็น 87.5% (95% CI: 46.7-99.3) และ 100% (95% CI: 74.7-99.4) ตามลำดับ ในเหงือกของปลาป่วย (n=15) ส่วนปลาปกติไม่แสดงอาการ (n=5) พบโคพีพอด *Lernanthropus* sp. และปลิงใส *Diplectanum* sp. จำนวน 4 ± 3.9 ตัว และ 89 ± 17.1 ตัว ตามลำดับ มีการติดเชื้อไวรัส SDDV คิดเป็น 40% (95% CI: 7.3-82.9) และ 60% (95% CI: 17.0-92.7) ตามลำดับ ผลตัวอย่างการตรวจปรสิตจากปลาป่วยตัวที่ 14-15 และปลาปกติไม่แสดงอาการตัวที่ 16-17 ดังภาพที่ 21 ซึ่งจะเห็นความเข้มของแบน ATPase 1 แบน 412 bp, 2 แบน 412 และ 738 bp ที่แตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้มีปริมาณเท่ากัน แสดงให้เห็นถึงระดับการติดเชื้อไวรัส SDDV แบบ light infection (+) และ heavy infection (++) ตามลำดับ และฟาร์ม 2 ปลาปกติ (n=5) พบโคพีพอด *Lernanthropus* sp. และปลิงใส *Diplectanum* sp. จำนวน 2 ± 1.4 ตัว และ 110 ± 32.4 ตัว ตามลำดับ ซึ่งไม่มีการตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV



ภาพที่ 21 แสดงผลการตรวจโรคไวรัส SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR จากปรสิต (L, *Lernanthropus* sp. and D, *Diplectanum* sp.) ที่พบในเหงือกปลาป่วยตัวที่ 14-15 และปลาปกติไม่แสดงอาการตัวที่ 16-17 จากฟาร์ม 1; M คือ 100 bp DNA ladder; N คือ ตัวควบคุมลบ (Negative control); P คือ ตัวควบคุมบวก (Positive control)

ตารางที่ 9 จำนวนปรสิตภายนอกที่พบในเหงือกปลาและผลการตรวจเชื้อไวรัส SDDV จากปรสิต

Fish no.	Number of parasites per fish		SDDV detection result	
	Lernanthropus sp.	*Diplectanum* sp.	*Lernanthropus* sp.	*Diplectanum* sp.
Farm 1 (affected farm)				
Clinically sick fish				
1	7	267	ND	++
2	6	170	ND	++
3	4	46	ND	++
4	2	112	ND	++
5	2	27	ND	++
6	2	13	ND	++
7	3	50	ND	++
8	5	24	++	++
9	3	154	-	++
10	8	560	++	++
11	19	470	++	++
12	6	245	++	++
13	4	318	++	++
14	7	95	++	++
15	9	224	+	++
Total	5 ± 4.3	154 ± 165.6	7/8 (87.5%)	15/15 (100%)
95% CI			46.7-99.3	74.7-99.4
Clinically healthy fish				
16	4	63	-	+
17	11	94	+	+
18	4	83	-	-
19	1	110	-	+
20	2	89	+	-
Total	4 ± 3.9	89 ± 17.1	2/5 (40%)	3/5 (60%)
95% CI			7.3-82.9	17.0-92.7
Farm 2 (non-affected farm)				
21	1	78	-	-
22	0	79	ND	-
23	3	111	-	-
24	0	127	ND	-
25	0	154	ND	-
Total	2 ± 1.4	110 ± 32.4	0/2 (0%)	0/5 (0%)
95% CI			4.9-80.2	1.9-53.7

ND, not done; -, negative, ++ = heavy infection; +, light infection

BURAPHA UNIVERSITY

4.3 การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดจากสิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยง

สิ่งมีชีวิตที่พบในระบบเลี้ยงปลาจากฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว ได้แก่ หอยนางรม (Oyster) หอยขี้นก (Mangrove periwinkle) ที่เกาะบริเวณเกาะเสาไม้ไผ่ของกระชัง และอาหารปลาสดบด (ปลาเหยื่อ) ดังภาพที่ 22 จากการตรวจหาเชื้อไวรัส SDDV จากสิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยง พบว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV ในหอยนางรมและหอยขี้นก แต่พบเชื้อไวรัส SDDV ในอาหารปลาสดบด ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดของปลาได้

ภาพที่ 22 สิ่งมีชีวิตในระบบเลี้ยงปลากะพงขาวจากฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว

4.4 การประยุกต์ใช้ตัวอย่างเลือดในการติดตามสุขภาพปลากะพงขาว

จากการตรวจเชื้อไวรัส SDDV พบว่า สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างที่ไม่ทำลายปลาได้ จากนั้นจึงได้เลือกตัวอย่างเลือดมาใช้ในการติดตามสุขภาพปลาระหว่างการเลี้ยงหลังจาก 13 เดือนที่มีการระบาดของโรคไวรัส SDDV (n=20) ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และยืนยันผลอีกครั้งด้วย qPCR พบว่ามีการติดเชื้อไวรัส เพียง 1 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเลือดมีความไวและประสิทธิภาพเหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการติดตามสุขภาพของปลากะพงขาวได้

4.5 การตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR

เนื่องจากตัวอย่างปลากะพงขาวที่ทำการศึกษา เป็นปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังตามธรรมชาติ ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพน้ำ และเรื่องสุขภาพได้ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจหาเชื้อก่อโรคชนิดอื่นด้วยเทคนิค PCR ได้แก่ *V. vulnificus*, *V. harveyi*, Flavobacteriaceae, *T. maritimum*, *S. iniae* และ NNV ซึ่งเป็นเชื้อที่เคยพบในปลากะพงขาว

4.5.1 แบคทีเรีย

แยกเชื้อแบคทีเรียจากตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อของปลาป่วยและปลาปกติที่ไม่แสดงอาการจากฟาร์ม 1 ได้ 22 เชื้อ นำมาทดสอบ biochemical test และเทคนิค PCR พบว่าเชื้อแบคทีเรีย SB1S, SB2K, SB4M01, SB4M02, SB5M01, SB5M02, SB7M01, SB7M03, SB10K, SB11K, SB12L, SB13K, SB14K, SB15L และ SB16S เป็นเชื้อ *V. harveyi* โดยตรวจพบยีน toxR และ VHHP (ตารางที่ 10) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย SB7M03 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้ยีน 16s rRNA (universal bacteria) พบว่ามีความเหมือนกับ *Vibrio harveyi* isolate VHJR2 (Accession no. DQ995235.1) 99.20%

4.5.2 เนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อของปลาป่วยและปลาปกติจากฟาร์ม 1 และ 2 โดยใช้ยีนทั้งหมด 7 ยีน ในการตรวจหาเชื้อก่อโรค ซึ่งมีทั้งเชื้อก่อโรคแคทีเรียและไวรัสที่พบได้ในปลากะพงขาว ดังนี้ *V. vulnificus*, *V. harveyi*, Flavobacteriaceae, *T. maritimum*, *S. iniae* และ NNV พบว่าปลากะพงขาวจากฟาร์ม 1 ที่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV ในปลาป่วยและปลาปกติไม่แสดงอาการตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* คิดเป็น 93.3% และ 60% ตามลำดับ ซึ่งไม่พบเชื้อก่อโรคชนิดอื่นเช่นเดียวกับปลากะพขาวจากฟาร์ม 2 (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลากะพงขาว 22 เชื้อ

bacteria	PCR (toxR/VHHP)	Biochemical test: Motility test	O-F test	Oxidase test	Catalase test	Gram stain
SB1S	+/+	+	+/+	+	+	-
SB2K	+/-	-	+/-	+	+	-
SB4M01	+/+	+	-/+	+	+	-
SB4M02	+/-	+	-/+	+	+	-
SB5M01	+/-	+	-/+	+	+	-
SB5M02	+/+	+	-/-	-	+	-
SB6K01	-/-	+	+/+	+	+	-/+
SB7M01	+/-	+	+/+	+	+	-
SB7M03	+/+	-	-/-	+	-	-
SB7L02	-/-	+	+/+	+	+	-
SB7L03	-/-	-	+/+	+	-	-
SB9K	-/-	+	+/+	+	-	-
SB10K	+/-	+	+/+	+	+	-
SB11L	-/-	+	+/+	+	+	-
SB11K	+/-	+	+/+	+	+	-
SB12L	+/-	+	+/+	+	+	-
SB13K	+/-	+	+/+	+	+	-
SB14K	+/-	+	+/+	+	+	-
SB15L	+/-	+	+/+	+	+	-
SB15S01	-/-	-	+/+	+	+	-
SB15S02	-/-	+	+/+	-	+	-
SB16S	+/-	+	+/+	+	+	-

*SB = sea bass, no. = fish no., L = Liver, K = Kidney, S = Spleen, M = Muscle

ตารางที่ 11 ผลการตรวจหาเชื้อก่อโรคต่างๆ ในเนื้อเยื่อปลากะพงขาวจาก 2 ฟาร์ม

Fish no.	Result of PCR					
	V. vulnificus	***V. harveyi* (toxR/VHHP)**	**Flavobacteriaceae**	***T. maritimum***	***S. iniae***	**NNV**
Farm 1 (SDDV affected farm)						
Clinically sick fish						
1	-	-/+	-	-	-	-
2	-	-/+	-	-	-	-
3	-	-/+	-	-	-	-
4	-	-/+	-	-	-	-
5	-	-/+	-	-	-	-
6	-	-/+	-	-	-	-
7	-	-/+	-	-	-	-
8	-	-/+	-	-	-	-
9	-	-/+	-	-	-	-
10	-	-/-	-	-	-	-
11	-	-/+	-	-	-	-
12	-	-/+	-	-	-	-
13	-	-/+	-	-	-	-
14	-	-/+	-	-	-	-
15	-	-/+	-	-	-	-
Total	0/15	14/15 (93.3%)	0/15	0/15	0/15	0/15
Clinically healthy fish						
16	-	-/-	-	-	-	-
17	-	-/+	-	-	-	-
18	-	-/-	-	-	-	-
19	-	-/+	-	-	-	-
20	-	-/+	-	-	-	-
Total	0/5	3/5 (60%)	0/5	0/5	0/5	0/5
Farm 2 (non-affected farm)						
21-25	-	-	-	-	-	-
Total	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

4.6 วิเคราะห์คุณภาพน้ำในกระชังจากฟาร์ม 1

ฟาร์ม 1 มีการระบาดของโรคไวรัส SDDV ซึ่งเป็นการเลี้ยงปลาในกระชังบริเวณปากแม่น้ำ จึงไม่สามารถควบคุมคุณภาพน้ำได้ ดังนั้น จึงได้เก็บตัวอย่างน้ำทั้งหมด 4 จุด มาวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ได้แก่ แอมโมเนีย ไนไตร์ท ไนเตรท และฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ปัจจัยคุณภาพน้ำในเดือน มกราคม 2562 พบว่า มีอุณภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียส ความเค็ม 29 ppt ค่า pH 7.23 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO) เท่ากับ 5.32 เมื่อวิเคราะห์หาค่าแอมโมเนีย ไนไตร์ท ไนเตรท และฟอสเฟต เท่ากับ 0.0111, 0.0010, 0.1251 และ 0.0222 ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ค่าคุณภาพน้ำบริเวณฟาร์ม 1 กระชังคลองพลิ้ว อ.แหลมสิงห์ จังหวัดจันทบุรี

Water quality	Water temperature (°C)	Salinity (ppt)	pH	DO (mg/L)	Ammonia (mg-N/L)	Nitrite (mg-N/L)	Nitrate (mg-N/L)	Phosphate (mg-P/L)
Farm 1	27	29	7.23	5.32	0.0111	0.0010	0.1251	0.0222

BURAPHA UNIVERSITY

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

5.1 อภิปรายผล

โรคเกล็ดหลุด เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งมีความสำคัญกับการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว เนื่องจากทำให้ปลากะพงขาวมีอัตราการตายประมาณ 40-50% และจะเกิดขึ้นกับปลาในระยะวัยรุ่นไปจนถึงตัวเต็มวัย ซึ่งมีรายงานการพบเชื้อนี้แล้วที่ประเทศสิงคโปร์ ไทย และมาเลเซีย พบว่าเชื้อไวรัส SDDV มีความเหมือนกัน 99.20% (Nurliyana et al., 2020) จากการตรวจวินิจฉัยโรคเกล็ดหลุดจากตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา ได้แก่ เลือด เมือก และครีบหาง ด้วยเทคนิค semi-nested PCR พบว่าตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา (non-lethal samples) สามารถตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV ได้เช่นเดียวกับตัวอย่างอวัยวะภายใน (lethal samples) ซึ่งเลือดและเมือกสามารถตรวจพบไวรัสได้ถึง 100% เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ferreira et al. (2019) ทำการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Betanodavirus ในปลา European seabass จากตัวอย่างเลือดซึ่งจะมีจำนวนไวรัสมากกว่าในสมอง ซึ่งใช้เป็นการประเมินการติดเชื้อในระยะแรกได้ มีการตรวจพบเชื้อไวรัส CNGV ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาคาร์บ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า ไวรัสจะเข้าสู่อวัยวะภายในอย่างรวดเร็วผ่านเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ติดเชื้อแล้ว และไวรัส สามารถเพิ่มจำนวนที่ไตและติดเชื้อที่ epithelial cell (Pikarsky et al., 2004) ดังนั้นไวรัส SDDV อาจจะแพร่กระจายในอวัยวะของปลาที่ติดเชื้อผ่านระบบหมุนเวียนเลือด จากงานวิจัยของ Leis et al. (2018) และ Liamnimitr et al. (2018) ตรวจพบไวรัส LMBV จากปลากะพงขาวปากกว้างในเมือกเช่นเดียวกับในอวัยวะภายใน และสามารถตรวจหาโรค TiLV จากปลานิล ในเมือกได้ ทำให้เกิดการถ่ายทอดแบบ horizontal สำหรับครีบหางตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Burbank et al. (2017) ครีบมีความไวในการตรวจพบไวรัสมากกว่าไตและม้ามในการตรวจวินิจฉัยโรค IHNV ในปลาเรนโบว์เทราต์

จากผลการศึกษาเลือด และเมือกในตัวอย่างกลุ่ม non-lethal จะมีความไวในการตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV สูงกว่าครีบหาง ซึ่งตัวอย่างเลือดจะมีความปราศจากเชื้อมาก และนำมาใช้ในการตรวจเพียง 200 µL แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น ปลาบางตัวไม่ให้เลือดหรือไม่สามารถดูดเลือดได้ ส่วนเมือก ปลาที่มีอาการป่วยมากๆ จะไม่ผลิตเมือกออกมา ซึ่งจะทำให้เมือกเป็นปัจจัยที่เราไม่สามารถเก็บได้ สำหรับครีบหาง อาจจะทำให้ปลามีโอกาสที่จะว่ายน้ำเอียง

จากการศึกษาปรสิตภายนอกในเหงือกปลา พบ 2 ชนิด ได้แก่ โคพีพอด *Lernanthropus* sp. และปลิงใส *Diplectanum* sp. พบจำนวนปรสิตในปลาป่วยมีมากกว่าปลาปกติ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sonthi, Worawas, and Nopphan (2016) พบการปรากฏของปรสิตภายนอกในปลากะพงขาวที่

เลี้ยงในกระชัง บริเวณปากแม่น้ำท่าแฉลบ จังหวัดจันทบุรี 2 ชนิด ที่บริเวณเหงือกเท่านั้น ได้แก่ ปลิงใส *Diplectanum* sp. และโคพีพอด *Lernanthropus* sp. มีความชุกของปลิงใสตลอดทั้งปี สำหรับโคพีพอด *Lernanthropus* sp. พบในเดือนมกราคมถึงมิถุนายนเท่านั้น และ Khrukhayan, Limsuwan, and Chuchird (2016) พบปลิงใส 3 สายพันธุ์ ในเหงือกปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชังบริเวณแม่น้ำปางปะกง จากการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสเกล็ดหลุดด้วยเทคนิค semi-nested PCR ตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV ใน โคพีพอด *Lernanthropus* sp. และปลิงใส *Diplectanum* sp. จากปลาป่วยและปลาปกติที่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV ของฟาร์ม 1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเหงือกปลาบริเวณที่มีการเกาะติดของปรสิตโคพีพอด *Lernanthropus* sp. และปลิงใส *Diplectanum* sp. มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ได้แก่ การฉีกขาดของเนื้อเยื่อ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การรวมกันของซี่เหงือก การยกตัวของเนื้อเยื่อบุผิว การบวมน้ำ secondary lamellae สั้น และการตกเลือด (Chotchaphan, Wongkham, Wattanachot, & Sonthi, 2019) การเข้าเกาะของปรสิตทั้ง 2 ชนิดนี้พร้อมกัน มีส่วนทำให้เส้นเหงือกถูกทำลาย อาจส่งผลให้ปลากะพงขาวเกิดความเครียด ภูมิต้านทานลดลง และอาจเกิดการยอมรับเชื้อได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานว่าเชื้อชนิดไหนเกิดขึ้นก่อน ดังนั้นปลาที่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV ปรสิตที่อยู่ในตัวปลาก็จะมีการติดเชื้อด้วย ซึ่งปรสิตเหล่านี้จะกินเลือดและเมือกของปลา เช่นเดียวกับการศึกษาของ Faisal and Schulz (2009) และ Salimi and Abdi (2016) พบโรค viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) ในปลาน้ำจืด จากอ่าว Anchor, Michigan และ infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) จากปรสิต leech

นอกจากนี้ยังพบเชื้อไวรัส SDDV ในตัวอย่างอาหารปลาสดที่บดละเอียด แต่ไม่สามารถระบุชนิดของปลาได้ จึงต้องมีการศึกษาต่อไป

จากการประยุกต์ใช้ตัวอย่างเลือดในการติดตามสุขภาพปลาหลังจากมีการเกิดโรคไวรัส SDDV 13 เดือน (n=20) ตรวจพบเชื้อไวรัส SDDV ด้วยเทคนิค semi-nested PCR และทำการยืนยันผลอีกครั้งด้วย qPCR พบเพียง 1 ตัวอย่าง จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเลือด เป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา สามารถนำมาใช้กับพ่อแม่พันธุ์หรือติดตามสุขภาพปลาระหว่างการเลี้ยงทั้งในบ่อดินและกระชัง โดยที่ไม่จำเป็นต้องฆ่าปลา เพื่อลดการสูญเสียปลากะพงขาวและการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส SDDV

การศึกษานี้ได้ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ร่วมกับโรคไวรัส SDDV จากงานวิจัยของ Dong et al. (2017) พบว่าเชื้อ *V. harveyi* เป็นสาเหตุของโรคเกล็ดหลุดและกล้ามเนื้อเสื่อม (Scale drop and muscle necrosis disease) เกิดการระบาดที่ประเทศเวียดนาม แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และโรคไวรัส SDDV ทำให้ปลากะพงขาวมีลักษณะอาการเกล็ดหลุดคล้ายกัน ทำให้ไม่สามารถทราบสาเหตุที่ก่อให้เกิดอาการเกล็ดหลุดในปลากะพงขาวอย่างชัดเจน

จากการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อม พบว่าปัจจัยคุณภาพน้ำมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่อุณหภูมิของน้ำลดต่ำลง จึงทำให้ปลามีการยอมรับเชื้อได้มากขึ้น เนื่องจากเมแทบอลิซึมของปลามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว

5.2 สรุปผล

5.2.1 ตัวอย่างที่ไม่ต้องทำลายปลา (เลือด เมือก และครีบหาง) สามารถนำมาตรวจวินิจฉัยโรคไวรัส SDDV ได้ ซึ่งเลือดและเมือกเป็นตัวอย่างที่ดีในการใช้ติดตามสุขภาพของปลากะพงขาว

5.2.2 ปลากะพงขาวป่วยและปกติในกระชังเดียวกัน (ฟาร์ม 1) มีการติดเชื้อไวรัส SDDV ซึ่งปรสิตภายนอกที่พบในเหงือกปลา (*Lernanthropus* sp. และ *Diplectanum* sp.) ตรวจพบการติดเชื้อด้วย

5.2.3 ปลากะพงขาวปกติ (ฟาร์ม 2) ไม่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV และตรวจไม่พบการติดเชื้อไวรัสในปรสิตภายนอกที่พบในเหงือกปลา (*Lernanthropus* sp. และ *Diplectanum* sp.)

5.2.4 ตรวจพบเชื้อในอาหารปลาสดบด (ปลาเหยื่อ) แต่ไม่สามารถระบุชนิดของปลาได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในปรสิตภายนอกต่อไป

5.3.2 ควรหาวิธีการป้องกันการเกิดโรคไวรัส SDDV ต่อไป เช่น วัคซีนทางการค้า เป็นต้น

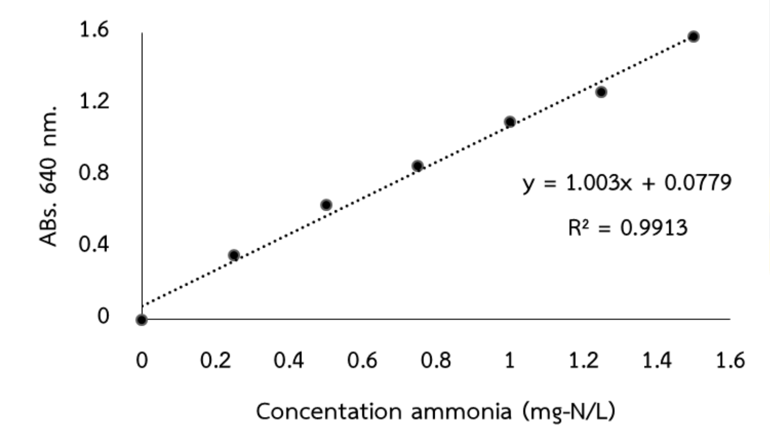
5.3.3 ควรศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของปลาที่มีการติดเชื้อไวรัส SDDV และหายได้เอง เพื่อนำความรู้ตรงนี้มาใช้ประโยชน์ในการรักษาและป้องกันการเกิดโรคต่อไปได้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1. การตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย (Parsons et al., 1984)

นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร และวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในหลอดทดลอง โดยใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Phenol, Sodium nitroprusside และ Oxidizing reagent ปริมาตร 0.2, 0.2 และ0.5 มิลลิลิตรตามลำดับ ผสมสารให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง (ห้ามเกิน 2 ชั่วโมง) เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer บันทึกผลและนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ไปคำนวณหาความเข้มข้นของแอมโมเนีย (มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) โดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานแอมโมเนีย

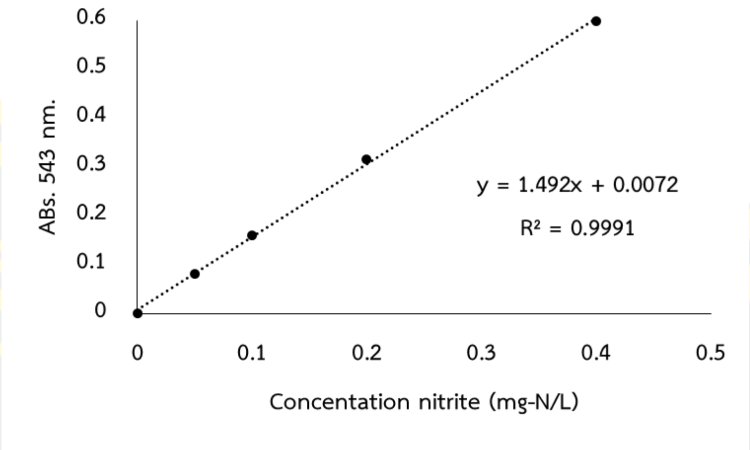


ภาพที่ ก-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายแอมโมเนีย

2. การตรวจวัดปริมาณไนไตรท์ (Parsons et al., 1984)

ตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร และวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในหลอดทดลอง โดยใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Sulfanilamide solution และ N-NED ปริมาตร 0.1 และ 0.1 มิลลิลิตรตามลำดับ ผสมสารให้เข้ากันเก็บไว้นาน 30 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืน

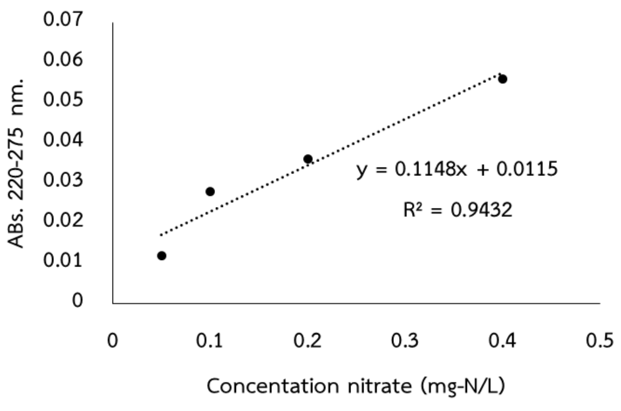
แสงที่ช่วงความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer บันทึกผลและนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ไปคำนวณหาความเข้มข้นของไนไตรท์ (มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) โดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานไนไตรท์



ภาพที่ ก-2 กราฟมาตรฐานของสารละลายไนไตรท์

3. การตรวจวัดปริมาณไนเตรท (APHA, 1999)

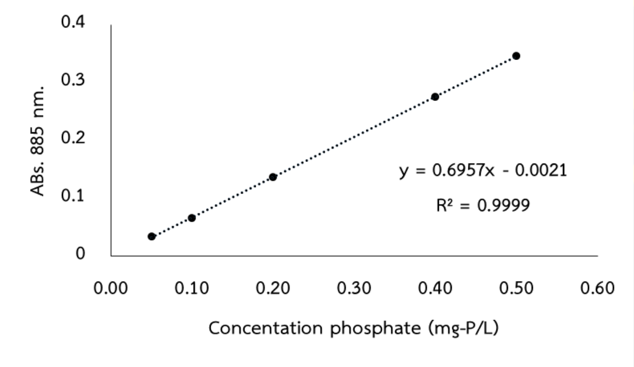
นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ขนาด 0.45 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากการวัดที่ความยาวคลื่น 220 และ 275 นาโนเมตร แล้วจึงนำผลต่างที่ได้ไปหาค่าความเข้มข้นของไนเตรท (มิลลิกรัม-ไนโตรเจนต่อลิตร) โดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของไนเตรท และนำความเข้มข้นที่ได้มาลบกับความเข้มข้นของไนไตรท์ในชุดตัวอย่างเดียวกัน



ภาพที่ ก-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายไนเตรท

4. การตรวจวัดปริมาณออร์โธฟอสเฟต (Parsons et al., 1984)

นำตัวอย่างน้ำมากรองผ่านกระดาษกรอง GF/C ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร และวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำในหลอดทดลอง โดยใช้ปริมาตรน้ำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Mix reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากัน เก็บไว้นาน 5 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 885 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer บันทึกผลและนำค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ไปคำนวณหาความเข้มข้นของฟอสเฟต (มิลลิกรัม-ฟอสฟอรัสต่อลิตร) โดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานฟอสเฟต



ภาพที่ ก-4 กราฟมาตรฐานของสารละลายฟอสเฟต

บรรณานุกรม

APHA. (1999). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Retrieved from American Public Health Association, Washington DC:

Aquaculture, F. F. a. (1996). Cultured Aquatic Species Information Programme Lates calcarifer (Block, 1790). Retrieved from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Lates_calcarifer/en#tcNA00EA

Burbank, D. R., Fehringer, T. R., & Chiaramonte, L. V. (2017). Comparison of Selected Nonlethal Samples from Adult Steelhead for Detection of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Using Cell Culture. *Journal of Aquatic Animal Health, 29*(2), 67-73. doi:10.1080/08997659.2016.1274690

Charoenwai, O., Meemetta, W., Sonthi, M., Dong, H. T., & Senapin, S. (2019). A validated semi-nested PCR for rapid detection of scale drop disease virus (SDDV) in Asian sea bass (Lates calcarifer). *Journal of Virological Methods, 268*, 37-41. doi:https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.03.007

Chotchaphan, P., Wongkham, W., Wattanachot, J., & Sonthi, M. (2019). Gill histopathology of cage cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) infected by *Lernanthropus* sp. and *Diplectanum* sp. . *KHON KAEN AGR. J., 47*(SUPPL. 2), 509-514.

Dangtip, S., Kampeera, J., Suvannakad, R., Khumwan, P., Jaroenram, W., Sonthi, M., . . . Kiatpathomchai, W. (2019). Colorimetric detection of scale drop disease virus in Asian sea bass using loop-mediated isothermal amplification with xylenol orange. *Aquaculture, 510*, 386-391. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.071

de Groof, A., Guelen, L., Deijs, M., van der Wal, Y., Miyata, M., Ng, K. S., . . . van der Hoek, L. (2015). A Novel Virus Causes Scale Drop Disease in Lates calcarifer. *PLOS Pathogens, 11*(8), e1005074. doi:10.1371/journal.ppat.1005074

Dong, H. T., Taengphu, S., Sangsuriya, P., Charoensapsri, W., Phiwsaiya, K., Sornwatana, T., . . . Senapin, S. (2017). Recovery of Vibrio harveyi from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, Lates calcarifer in Vietnam. *Aquaculture, 473*, 89-96. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.005

Faisal, M., & Schulz, C. A. (2009). Detection of Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV) from the leech Myzobdella lugubris Leidy, 1851. *Parasites & Vectors, 2*(1), 45. doi:10.1186/1756-3305-2-45

Ferreira, I. A., Costa, J. Z., Macchia, V., Dawn Thompson, K., & Baptista, T. (2019). Detection of Betanodavirus in experimentally infected European seabass (Dicentrarchus labrax, Linnaeus 1758) using non-lethal sampling methods. *Journal of Fish Diseases, 42*(8), 1097-1105. doi:10.1111/jfd.13015

Fulton-Howard, B. (2008). *Lates calcarifer*. Retrieved from https://animaldiversity.org/accounts/Lates_calcarifer/

Gibson-Kueh, S., Chee, D., Chen, J., Wang, Y. H., Tay, S., Leong, L. N., . . . Ferguson, H. W. (2012). The pathology of 'scale drop syndrome' in Asian seabass, Lates calcarifer Bloch, a first description. *Journal of Fish Diseases, 35*(1), 19-27. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01319.x

Khrukhayan, P., Limsuwan, C., & Chuchird, N. (2016). Seasonal variation of Diplectanid Monogeneans in cage cultured Seabass from Bangpakong River, Thailand. *KASETSART UNIVERSITY FISHERIES RESEARCH BULLETIN, 40*(2), 68-78.

Leis, E., McCann, R., Standish, I., Bestul, A., Odom, T., Finnerty, C., & Bennie, B. (2018). Comparison of Lethal and Nonlethal Sampling Methods for the Detection of Largemouth Bass Virus (LMBV) from Largemouth Bass in the Upper Mississippi River. *Journal of Aquatic Animal Health, 30*(3), 217-225. doi:10.1002/aah.10029

Liamnimitr, P., Thammatorn, W., U-thoomporn, S., Tattiyapong, P., & Surachetpong, W. (2018). Non-lethal sampling for Tilapia Lake Virus detection by RT-qPCR and cell culture. *Aquaculture, 486*, 75-80. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.015

Nurliyana, M., Lukman, B., Ina-Salwany, M. Y., Zamri-Saad, M., Annas, S., Dong, H. T., . . . Amal, M. N. A. (2020). First evidence of scale drop disease virus in farmed Asian seabass (Lates calcarifer) in Malaysia. *Aquaculture, 528*, 735600. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735600

Parsons, T. R., Maita, Y., & Lalli, C. M. (1984). *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Retrieved from Great Britain:

Pikarsky, E., Ronen, A., Abramowitz, J., Levavi-Sivan, B., Hutoran, M., Shapira, Y., . . . Kotler, M. (2004). Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *Journal of virology, 78*(17), 9544-9551. doi:10.1128/JVI.78.17.9544-9551.2004

Richards, C. A., Murphy, C. A., Brenden, T. O., Loch, T. P., & Faisal, M. (2017). Detection accuracy of Renibacterium salmoninarum in Chinook salmon, Oncorhynchus tshawytscha (Walbaum) from non-lethally collected samples: Effects of exposure route and disease severity. *Preventive Veterinary Medicine, 145*, 110-120. doi:https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.06.001

Salimi, B., & Abdi, K. (2016). Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus from the Leeches Hemiclepsis marginata and Hirudo medicinalis. *Journal of Aquatic Animal Health, 28*(4), 209-213. doi:10.1080/08997659.2016.1206635

Senapin, S., Dong, H. T., Meemetta, W., Gangnonngiw, W., Sangsuriya, P., Vanichviriyakit, R., . . . Nuangsaeng, B. (2019). Mortality from scale drop disease in farmed Lates calcarifer in Southeast Asia. *Journal of Fish Diseases, 42*(1), 119-127. doi:10.1111/jfd.12915

Snow, M. (2011). The contribution of molecular epidemiology to the understanding and control of viral diseases of salmonid aquaculture. *Veterinary Research, 42*(1), 56-56. doi:10.1186/1297-9716-42-56

Sonthi, M., Worawas, S., & Nopphan, S. (2016). The Prevalence of Ectoparasites on a Floating Cages Cultured Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*) from Tha-Chalap Estuary, Chanthaburi Province. *King Mongkut's Agricultural Journal, 34*(2), 94-104.

Sriisan, S., Boonchird, C., Thitamadee, S., Sonthi, M., Dong, H. T., & Senapin, S. (2020). A highly sensitive and specific SYBR Green quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method for rapid detection of scale drop disease virus in Asian sea bass. *Dis Aquat Org, 139*, 131-137. doi:https://doi.org/10.3354/dao03484

บรรณานุกรม

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	อรอนงค์ เจริญไวย์
วัน เดือน ปี เกิด	20 กรกฎาคม 2538
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	57/2 ม.1 มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ต.โขมง อ.ท่าใหม่ จ.จันทบุรี 22170
ตำแหน่งและประวัติการทำงาน	-
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2556 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนพญาลอวิทยาคม จ.พะเยา พ.ศ. 2560 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี
รางวัลหรือทุนการศึกษา	พ.ศ. 2558 ได้รับทุนกุ้งจันท์ ตะวันออกแฟร์ พ.ศ. 2559 ได้รับทุนจากบริษัทมูบาดาลา ปิโตรเลียม (ประเทศไทย) จำกัด พ.ศ. 2562-2563 ได้รับทุน TGIST จากสวทช.