

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.tci-thaijo.org/index.php/jmvm/

โรคอุบัติใหม่ในกุ้ง: Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1) Infection

สำราญ บรรณจิรกุล^{1, #}¹คลินิกสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร 140 ถนนเชื่อมสัมพันธ์ หนองจอก กรุงเทพมหานคร 10530

บทคัดย่อ: Decapod iridescent virus 1 (DIV1) จัดเป็นเชื้อไวรัสที่อุบัติใหม่และก่อให้เกิดความเสียหายในการเลี้ยงกุ้งทะเลและกุ้งน้ำจืด ลักษณะกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อพบเนื้อเยื่อรอบกรีไต์เปลือกส่วนหัวมีการเปลี่ยนเป็นสีขาวรูปสามเหลี่ยม และมีการตายเฉียบพลัน ส่วนในกุ้ง penaeid ที่ติดเชื้อไม่พบอาการที่เด่นชัด ดังนั้นวิธีการตรวจทางชีวโมเลกุลจึงเป็นสำหรับการตรวจวินิจฉัยยืนยันเชื้อ DIV1 การสร้างระบบความปลอดภัยทางชีวภาพร่วมกับการตรวจเฝ้าระวังเชื้อควรพิจารณาในการกำหนดกลยุทธ์ที่ใช้ป้องกันการระบาดของโรคในฟาร์มกุ้ง

คำสำคัญ: Decapod iridescent virus 1 (DIV1) โรคอุบัติใหม่ กุ้ง

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2563. 15(2): 223-230.

E-mail address: sumrarn@mut.ac.th

Emerging Disease in Shrimp; Decapod Iridescent Virus 1 Infection

Sumrarn Bunnajirakul^{1,#}

¹Aquatic Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology,
140 Cheum-samphan road, Nong chok, Bangkok 10530 Thailand

Abstract: Decapod iridescent virus 1 (DIV1) is threatening as emerging pathogen in shrimp industry. The emergence of this pathogen caused serious health impact on both freshwater and marine prawn. Infected giant freshwater shrimp showed alteration of tissue at rostrum surrounding beneath carapace to whitish triangle area and high mortality rate. Typical clinical sign for infected penaeid shrimps was rarely observed. Molecular detection methods for this pathogen were recommended for confirmatory diagnosis. Biosecurity and surveillance program should be considered for preventive strategies of shrimp farm.

Keywords: Decapod iridescent virus 1 (DIV1), Emerging disease, Shrimp

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2020 15(2): 223-230.

E-mail address: sumrarn@mut.ac.th

บทนำ

อุตสาหกรรมกุ้งได้รับผลกระทบจากโรคต่างๆ ในช่วงที่ผ่านมาก่อให้เกิดการผลิตและการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างรุนแรง ความเสียหายที่ส่งผลสุขภาพกุ้งมาจากการติดเชื้อไวรัส เช่น WSSV, TSV, YHV การติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น luminous vibriosis, AHPND และการติดเชื้อปรสิตในจำพวก EHP ซึ่งสายพันธุ์กุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวแวนนาไม นอกจากนั้นกุ้งก้ามกราม (giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*) จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณค่าในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเอเชียโดยเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เช่น มาเลเซีย เวียดนาม กัมพูชา ไทย เมียนมาร์ บังคลาเทศ อินเดีย ศรีลังกา และฟิลิปปินส์ (Hameed, 2009; Rao *et al.*, 2016) โดยทั่วไปกุ้งก้ามกรามมีแนวโน้มค่อนข้างน้อยในการติดเชื้อไวรัสเมื่อเทียบกับกุ้งสายพันธุ์อื่น ทั้งนี้ไวรัส

บางชนิดมีรายงานการติดเชื้อในกุ้งก้ามกรามได้ เช่น *Macrobrachium hepatopancreatic parvo-like virus* (MHPV) *Macrobrachium muscle virus* (MMV) *Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus* (IHNV) *White spot syndrome virus* (WSSV) *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) *Extra small virus like particle* (XSV) *Covert mortality nodavirus* (CMNV) (Bonami *et al.*, 2011; Sahul Hameed *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017)

สาเหตุ

Decapod iridescent virus 1 (DIV1) จัดอยู่ใน family Iridoviridae subfamily Betairidovirinae genus Decapodiridovirus โดยมีรูปร่างแบบ icosahedral จัดเป็นขนาดใหญ่ที่มีขนาดเท่ากับ 158 nm (Qiu *et al.*, 2019) ภายใน genome ประกอบด้วย

linear, dsDNA ขนาดประมาณ 165 kbp มีสัดส่วนของ G+C content ที่ 35% และมี 170 putative ORFs. (ICTV, 2019) ทั้งนี้ DIV 1 มีรายงานการพบในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ในชื่อ shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV)(Qiu et al., 2017) และใน redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) ในชื่อ *Cherax quadricarinatus* iridovirus (CQIV)(Xu et al., 2016) จากการตรวจวิเคราะห์ทาง phylogenetic analysis พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างมาก จึงมีการเปลี่ยนชื่อในปัจจุบันตามระบบของ International Committee on Taxonomy of Viruses เป็น Decapod iridescent virus 1

ระบาดวิทยา

DIV1 จัดเป็นไวรัสที่ก่อความเสียหายอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่นำมาบริโภคที่ทางหน่วยงานติดตามการเกิดโรคทั้งในส่วนภาคพื้น เช่น Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA)โดยมีการรายงานผ่านทาง Quarterly Aquatic Animal Disease Report (NACA, 2020) รวมทั้งหน่วยงานระดับนานาชาติ เช่น OIE (OIE, 2019) ให้ความสำคัญและติดตามสถานการณ์ของการเกิดอุบัติการณ์อย่างใกล้ชิด การระบาดพบครั้งแรกปี 2014 ในฟาร์มกุ้งทางชายฝั่งของจังหวัดเจียงซูในสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยหน่วยงาน Chinese Academy of Fishery Sciences ได้ทำการตรวจพบไวรัส DIV1 ในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ซึ่งเป็นสายพันธุ์หลักที่เลี้ยงในจังหวัด Zhejiang ทั้งนี้พบได้ในกุ้งก้ามกราม (*M. rosenbergii*) และกุ้งสายพันธุ์อื่นๆ เช่น red claw crayfish (*C. quadricarinatus*) red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) (Xu et al., 2016; Qiu et al., 2017; Qiu et al., 2019; Chen et al., 2019) นอกจากนี้มีการทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยใช้

2 สายพันธุ์ คือ *Eriocheir sinensis* และ *Pachygrapsus crassipes* ที่สามารถเกิดการติดเชื้อดังกล่าวด้วยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Pan et al., 2017)

อาการทางคลินิก

DIV1 (Decapod iridescent virus 1) สามารถติดต่อได้ทุกช่วงอายุของกุ้ง (Postlarva, juvenile and adult) ทำให้อัตราการตายของกุ้งที่ติดเชื้อมีค่อนข้างสูงหลังจากที่พบว่าป่วยเพียงไม่นาน จึงทำให้ความเสียหายค่อนข้างมาก กุ้งที่ป่วยว่ายน้ำเชื่องช้า การกินอาหารลดลง รอยโรคที่พบในกุ้งก้ามกรามพบเนื้อเยื่อรอบกริได้เปลี่ยนสีขาวมีการเปลี่ยนเป็นสีขาวรูปสามเหลี่ยมที่เรียกว่า “white head” หรือ “white spot” ส่วนของทางเดินอาหารตั้งแต่ส่วนของกระเพาะตลอดจนลำไส้ว่าง เปลือกลำตัวนิ่ม กล้ามเนื้อลำตัวสีแดง หนวดหักหรือบิดงอ ส่วนปล้องหัวมีสีเหลืองซีดเนื่องจากส่วนของ hepatopancreas ได้รับความเสียหาย กุ้งที่ติดเชื้อส่วนใหญ่จะจมตัวที่พื้นบ่อ และทำให้เกิดอัตราการตายแบบเฉียบพลัน (Chen et al. 2019; Qiu et al. 2017; Qiu et al. 2019)

การตรวจวินิจฉัย

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจะพบ dark eosinophilic inclusions and pyknosis และ basophilic, cytoplasmic inclusions ใน hematopoietic tissue, hepatopancreas และ hemocytes ในซีเหงือกของกุ้ง *M. Rosenbergii* ส่วนใน *M. Nipponense* พบ dark eosinophilic inclusions และ karyopyknosis ใน hepatopancreas (Qiu et al., 2019) lymphoid organ (LO) มีการเสื่อมสลายของ LO-tubule ร่วมกับการเกิด karyorrhectic และ pyknotic nuclei

การตรวจสอบด้วยวิธี *In situ* digoxigenin-labeled loop-mediated isothermal amplification (ISDL) โดยติดตาม gene ของ second largest subunit

ตารางที่ 1 PCR primers used for detection/ characterization of Decapod iridescent virus 1

PCR Detection Methods	Target gene	Primer sequence (5' - 3')	แหล่งอ้างอิง
Nested PCR			
The first-step PCR	DIV1 ATPase gene	SHIV-F1:	Qiu et al., 2017
		GGG CGG GAG ATG GTG TTA GAT	
		SHIV-R1:	
		TCG TTT CGG TAC GAA GAT GTA	
The second step of the (nested) PCR		SHIV-F2:	
		CGG GAA ACG ATT CGT ATT GGG	
		SHIV-R2:	
		TTG CTT GAT CGG CAT CCT TGA	
Real-time PCR			
Primers and probe for DIV1-MCP qPCR	DIV1 MCP gene	142F:	Qiu et al., 2020
		AAT CCA TGC AAG GTT CCT CAG G	
		142R:	
		CAA TCA ACA TGT CGC GGT GAA C	
		TaqMan probe : CCA TAC GTG CTC GCT CGG CTT CGG	
		; labeled with 6-FAM at the 5' end and TAMRA at the 3' end	
Primers and probe for DIV1-ATPase qPCR	DIV1 ATPase gene	SHIV-F:	Qiu et al., 2018b
		AGG AGA GGG AAA TAA CGG GAA AAC	
		SHIV-R:	
		CGT CAG CAT TTG GTT CAT CCA TG	
		The TaqMan Probe :	
		CTG CCC ATC TAA CAC CAT CTC CCG CCC	

of DNA-directed RNA polymerase II of DIV1 ในกุ้ง *M. rosenbergii* ให้ blue signals ใน hematopoietic tissue และ hemocytes ที่แทรกอยู่ใน hepato-pancreatic sinus และซีเหงือก ส่วนการทำ *in situ* hybridization (ISH) analysis ด้วย digoxigenin

labeled 279 bp probe ใน *P. vannamei* จะให้ผลบวกต่อ ISH reaction ในส่วนของเนื้อเยื่อที่มีรอยโรคหลายตำแหน่ง เช่น ซีเหงือก connective tissue ที่แทรกตามปล้องส่วน cephalothorax และปล้องท้อง hepatopancreas ส่วนของ anterior midgut cecum

นอกจากนั้นอาจพบบริเวณ ventral nerve cord และใต้ชั้น subcuticular epithelium รวมทั้ง antennal gland กล้ามเนื้อหัวใจ และกล้ามเนื้อในปล้องลำตัว (Qiu et al. 2017; Qiu et al., 2019; Chen et al., 2019; Sanguanrut et al., 2020)

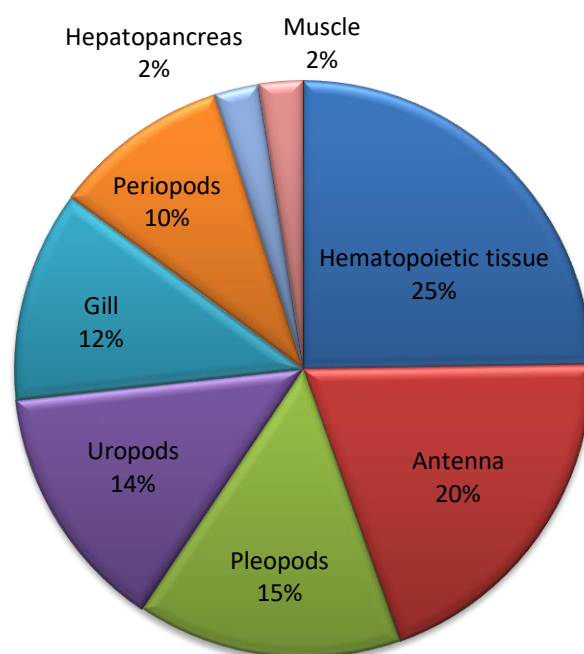
การตรวจสอบเนื้อเยื่อผ่าน Transmission electron microscopy (TEM) ด้วย ultrathin sections พบ enveloped icosahedral virus-like particles with typical non-enveloped iridescent viral structure ใน hemocytes ของ hemal sinuses ใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อ (Qiu et al. 2017)

การตรวจสอบด้วยวิธีชีวโมเลกุล (Polymerase chain reaction: PCR) ด้วยวิธี Nested PCR (Qiu et

al., 2017) และ Real-time PCR (Qiu et al., 2020; Qiu et al., 2018b) ดังตารางที่ 1

วิธีการตรวจด้วยวิธี qPCR สามารถพบ 1.2 copies of target DNA ทั้งนี้ Real-time PCR methods จะให้ sensitivity และ specificity อยู่ที่ 97.2% และ 98.7% ตามลำดับ (Qiu et al., 2020) ผลการตรวจทาง Quantitative detection with TaqMan probe โดยใช้ real-time PCR จากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนที่ได้จากการติดเชื้อตามธรรมชาติใน *M. rosenbergii* พบปริมาณค่อนข้างสูงของ DIV1 ใน hematopoietic tissue ถึง $25.4 \pm 16.9\%$ ขณะที่เนื้อเยื่อที่ได้จาก Hepatopancreas และกล้ามเนื้อพบปริมาณเชื้อค่อนข้างต่ำที่ $2.44 \pm 1.24\%$ และ $2.44 \pm 2.16\%$ ตามลำดับ (Qiu et al., 2019)

Relative abundance of DIV1 for differences tissues of infected shrimp



รูปที่ 1 แสดงสัดส่วนปริมาณเชื้อ DIV1 ที่ตรวจพบจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของ *M. rosenbergii* (ดัดแปลงจาก Qiu et al., 2019)

การควบคุมป้องกัน

มาตรการที่สำคัญในการจัดการฟาร์ม ได้แก่ การเข้มงวดระบบความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการป้องกันและควบคุมเชื้อ DIV1 ที่จะเข้าสู่ภายในฟาร์ม (Huang et al., 2017) การจัดทำแผนเฝ้าระวังโรค การกักกันโรคส่วนกุ้งพ่อแม่พันธุ์ ลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก รวมทั้งการตรวจรับรองสุขภาพจัดเป็นสิ่งเร่งด่วนที่ควรดำเนินการ ทั้งนี้หน่วยงานที่ทำการตรวจรับรองสุขภาพควรมีความสามารถในการตรวจคัดกรองเชื้อ DIV1 ที่มีประสิทธิภาพ การตรวจวินิจฉัยยืนยัน (Confirmatory diagnosis) ควรตรวจสอบด้วยวิธีชีวโมเลกุลที่กล่าวมาข้างต้น เนื่องจากลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิที่พบในกุ้งไม่มีลักษณะเฉพาะ นอกจากที่เห็นการเปลี่ยนแปลงของ hematopoietic tissue ในกุ้ง ก้ามกรามที่ป่วย การเลี้ยงแบบหลากหลายพันธุ์ (polyculture) ที่มีกุ้ง หลายชนิด หรือร่วมกับ crustacean ชนิดอื่นอาจจะต้องพิจารณาให้รอบคอบ เนื่องจากอาจเป็นช่องทางที่มีการปนเปื้อนเชื้อเข้าสู่ฟาร์ม (Qiu et al., 2019) มีรายงานการเลี้ยงปลา river puffer (*Takifugu obscurus*) กำจัดกุ้งที่ป่วยจากฝูง (Jang et al., 2007) นอกจากนั้นตรวจสอบความสะอาดของอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งพ่อแม่พันธุ์ เช่น เปรียง รวมทั้งเข้มงวดสุขลักษณะของเครื่องมือในโรงเรือนเพาะชำและบ่อเลี้ยง

เอกสารอ้างอิง

Bonami, J. R. and J. Sri Widada. 2011. Viral diseases of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: A review. J. Invertebr. Pathol. 106: 131-142.

Chen, X., L. Qiu, H. Wang, P. Zou, X. Dong, F. Li, and J. Huang. 2019. Susceptibility of *Exopalaemon carinicauda* to the infection with Shrimp hemocyte iridescent virus

(SHIV 20141215), a strain of Decapod iridescent virus 1 (DIV1). Viruses. 11(4): 387.

Hameed, A. S. S. 2009. Viral infections of *Macrobrachium* spp.: Global status of outbreaks, diagnosis, surveillance, and research. Isr. J. Aquac. 61: 240-247.

Huang, J., X. Dong, Q. L. Zhang, X. Y. Wan, G. S. Xie, B. Yang, X. H. Wang, Y. Liang, H. Xu, C. Li, and X. L. Song. 2017. Epidemiology and biosecurity for shrimp farming industry. The 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 28 Aug - 1 Sept, 2017, Bali, Indonesia. https://www.researchgate.net/publication/320254729_Epidemiology_and_biosecurity_for_shrimp_farming_industry. (Accessed 6 May 2020).

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2019. Genus: Decapod-iridovirus. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/iridoviridae/1301/genus-decapodiridovirus. (Accessed 6 May 2020).

Jang, I. K., J. C. Jun, G. J. Jo, Y. R. Cho, H. C. Seo, B. L. Kim, and J. S. Kim. 2007. Polyculture of fleshy shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and white shrimp *Litopenaeus vannamei* with river puffer *Takifugu obscurus* in shrimp ponds. J. Aquaculture (In Korean). 20(4): 278-288.

Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA). 2020. DISEASE ADVISORY: Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1): an emerging threat to the shrimp industry. <https://enaca.org/?id=1098&title=decapo>

- d-iridescent-virus-1-an-emerging-threat-to-the-shrimp-industry. (Accessed 2 May 2020).
- OIE. 2019. Aquatic Animal Health Code. <https://www.oie.int/standard-setting/aquatic-code>. (Accessed 2 May 2020).
- Pan, C. K., H. F. Yuan, T. T. Wang, F. Yang, and J. M. Chen. 2017. Study of *Cherax quadricarinatus* iridovirus in two crab. *Journal of Applied Oceanography*. 36(1): 82-86 (in Chinese)
- Qiu, L., M. M. Chen, X. Y. Wan, C. Li, Q. L. Zhang, R. Y. Wang, D. Y. Cheng, X. Dong, B. Yang, X. H. Wang, J. H. Xiang, and J. Huang. 2017. Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, 7(1):11834.
- Qiu, L., M. M. Chen, X. Y. Wan, Q. L. Zhang, C. Li, X. Dong, B. Yang, and J. Huang. 2018b. Detection and quantification of Shrimp hemocyte iridescent virus by TaqMan probe based real-time PCR. *J. Invertebr. Pathol.* 154: 95-101.
- Qiu, L., X. Chen, R. H. Zhao, C. Li, W. Gao, Q. L. Zhang, and J. Huang. 2019. Description of a Natural Infection with Decapod Iridescent Virus 1 in Farmed Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Viruses*. 11(354): 1-14.
- Qiu, L., X. Chen, R. H. Zhao, C. Li, W. Gao, Q. L. Zhang, and J. Huang. 2020. First report and description of Decapod Iridescent Virus-1 in giant freshwater prawns. <https://www.aquaculturealliance.org>. (Accessed 2 May 2020).
- Qiu, L., X. Chen, X. M. Guo, W. Gao, R. H. Zhao, Q. L. Zhang, B. Yang, and J. Huang. 2020. A TaqMan probe based real-time PCR for the detection of Decapod iridescent virus 1. *J. Invertebr. Pathol.* 173: 107367.
- Rao, R., S. Bhassu, R. Z. Bing, T. Alinejad, S. S. Hassan, and J. Wang. 2016. A transcriptome study on *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas experimentally challenged with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Invertebr. Pathol.* 136: 10-22.
- Sahul Hameed A. S. and J. R. Bonami. 2012. White tail disease of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Indian J. Virol.* 23: 134-140.
- Sanguanrut, P., D. Thaiue, J. Thawonsuwan, T. W. Flegel, and K. Sritunyalucksana. 2020. Urgent announcement on usefulness of the lymphoid organ (LO) as an additional prime target for diagnosis of decapod iridescent virus 1 (DIV1) in diseased *P. vannamei*. *NACA Newsletter*, ISSN0115-8503, 2020, XXXV: 2. <https://enaca.org/?id=1092>.
- Xu, L., T. Wang, F. Li, and F. Yang. 2016. Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Org.* 120(1): 17-26.

Zhang, Q. L., T. T. Xu, X. Y. Wan, S. Liu, X. H. Wang, X. P. Li, X. Dong, B. Yang, and J. Huang. 2017. Prevalence and distribution of Covert mortality nodavirus (CMNV) in cultured crustacean. Virus. Res. 233: 113–119.

