วิธีการทางอณูพันธุศาสตร์สำหรับการวินิจฉัยโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม

Molecular Genetic Methods for Diagnosis of White Spot Syndrome in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

รัชชานนท์ กุศลสงเคราะห์กุล วาสนา ศิริแสน ปองพล พงไธสงค์ และ วุฒิชัย เคนไชยวงศ์*

Ratchanon Kusolsongkhrokul, Vassana Sirisan, Pongphol Pongthaisong and Wootichai Kenchaiwong*

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ. มหาสารคาม 44000

Faculty of Veterinary Sciences, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44000, Thailand

**Corresponding author: Email: wootken@gmail.com*

(Received: 5 February2020; Accepted: 22 April 2020)

Abstract: White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is the most shrimp cultured in the world when disease outbreaks that will affect the shrimp farming industry. White spot syndrome is an important disease due to high morbidity rate and high mortality rates. Currently, there are methods for detecting and diagnosing white spots syndrome. Recommended method is polymerase chain reaction (PCR) for screening and confirmation diagnosis according to high sensitivity and high specificity and can be detected in shrimp almost every stage. The method by using parameter including clinical sign, gross pathology, histopathology should be diagnosed with an immunological method or molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR), Antigen-antibody detection methods, DNA sequencing, Fluorescence in-situ hybridisation (FISH) and Loop-mediated isothermal amplification techniques (LAMP). Other the transmission electron microscope, biological analysis method and cell culture can detecting and diagnosing for confirmation, but not recommended due to their low susceptibility.

Keywords: White shrimp, white spot syndrome, diagnostic, molecular methods

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei)* เป็นกุ้งสายพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุดในโลก เมื่อเกิดโรคระบาดจะส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยมีโรคจุดขาวเป็นโรคที่สำคัญ เนื่องจากอัตราการป่วย และอัตราการตายสูง ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจหาและวินิจฉัยโรคจุดขาวที่แนะนำ คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเพื่อวินิจฉัยเบื้องต้นและยืนยัน เนื่องจากมีความไวและจำเพาะต่อเชื้อและสามารถตรวจได้ในกุ้งเกือบทุกระยะ วิธีการสังเกตอาการทางคลินิก วิธีการทางมหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา ควรได้รับการวินิจฉัยยืนยันด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกัน หรือวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR) การตรวจหาแอนติเจนแอนติบอดี การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ การตรวจด้วยสารเรืองแสง (FISH) และเทคนิค LAMP ส่วนวิธีกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน วิธีชีววิเคราะห์ และการเพาะเลี้ยงเซลล์ สามารถตรวจเพื่อยืนยันได้แต่ไม่แนะนำเนื่องจากมีความไวต่อเชื้อต่ำ

คำสำคัญ: กุ้งขาว โรคจุดขาว การวินิจฉัยโรค วิธีการทางอณูพันธุศาสตร์

คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนมีความสำคัญในหลายภูมิภาค ประกอบไปด้วยทวีปเอเชียคิดเป็น 89% ทวีปอเมริกา 10% โดยอีก 1% มีการเพาะเลี้ยงในทวีปแอฟริกาและในมหาสมุทร ความสำคัญในแง่ของการผลิตเชิงพาณิชย์ขนาดใหญ่ กุ้งมีความสำคัญมากที่สุดซึ่งการผลิตกุ้งทั่วโลกคิดเป็น 90% และส่วนที่เหลือคือกลุ่มครัสเตเชียนอื่น ๆ อีก 10% และกุ้งที่มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุดคิดเป็น 53% ของการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งหมดคือ กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei)* (FAO, 2018) ทั้งนี้เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงตามชายฝั่งทั่วโลกมีความทนทานต่อการเพาะเลี้ยงที่มีความหนาแน่นสูงและมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว สำหรับประเทศไทยพบว่ามีทิศทางเพิ่มขึ้นจากข้อมูลการผลิตกุ้งขาวแวนนาไม ปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยผลิตได้ 0.259 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2560 คิดเป็น 5.4% การขยายตัวของการผลิตเนื่องจากการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่มาใช้ในการผลิตและคุณภาพของอาหารมีการพัฒนา ส่งผลให้ผลผลิตต่อพื้นที่เพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงทั่วไปมักพบปัญหา ได้แก่ พื้นที่เพาะเลี้ยงที่มีจำกัด พันธุ์กุ้งมีความอ่อนแอส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตต่ำ ภูมิอากาศที่มีความแปรปรวนมากขึ้น และที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ ปัญหาของโรคกุ้งที่ระบาดทั่วโลก และมีความรุนแรงมากขึ้น (FAO, 2018; Li *et al*., 2019; Tokrisna *et al*., 2015)

โรคระบาดของกุ้งจัดอยู่ในบัญชีโรคสัตว์น้ำขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ หากเกิดการตรวจพบในสินค้าการเกษตร ส่งผลให้เกิดการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ และหากติดจากพ่อแม่พันธุ์สู่ลูกกุ้ง ส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อ สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเพิ่มสูงขึ้น (Nunan and Lightner, 2011) โดยหนึ่งในโรคระบาดที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งชนิดอื่น คือ โรคจุดขาวเกิดจากการติดไวรัส white spot syndrome virus (WSSV) กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับผลกระทบจากโรคจุดขาวในช่วงแรกของการติดเชื้อมักไม่แสดงอาการผิดปกติหรือรอยโรคที่บ่งชี้ เกิดความล่าช้า และคลาดเคลื่อน ส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยง หากกุ้งขาวมีการที่ติดเชื้อระยะหนึ่งจะพบอาการป่วยแบบเฉียบพลันซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 80-100% ภายใน 5 วันหลังติดเชื้อ (National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards, 2007) ส่วนอาการแบบเรื้อรังพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะไม่มีรอยโรคและไม่ตาย ซึ่งในกรณีนี้ถือว่าเป็นสิ่งที่ต้องระวัง เนื่องจากจะส่งผลกระทบในอุสาหกรรมการส่งออกกุ้ง และการคัดเลือกกุ้งเป็นพ่อแม่พันธุ์เนื่องจากเชื้อสามารถติดผ่านทางไข่ได้ (National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards, 2007; OIE, 2006) มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติได้กำหนดให้มีการชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้งขาว 2 วิธีหลัก ได้แก่ การตรวจด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology method) และการตรวจด้วยวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น ปฏิกิริยาห่วงโซ่โพลิเมอเรส

(polymerase chain reaction (PCR) method) อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยที่ดีควรสามารถยืนยันการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว และต้องมีความไวและจำเพาะต่อโรคเป็นสำคัญ โดยส่วนใหญ่มักเป็นวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ (Durand and Lightner, 2002; Piepenburg *et al*., 2006; Yang *et al*., 2014) ดังนั้นในบทความนี้จึงอธิบายวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม ทั้งวิธีแบบดั้งเดิมและวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ เพื่อให้เห็นถึงความเหมาะสมในการการวินิจฉัยโรคจุดขาวที่มีความไวและจำเพาะต่อเชื้อ เพื่อลดความเสียหายจากการติดเชื้อ สำหรับการวางแผนการรักษา และการป้องกันโรคที่จะแพร่กระจายต่อไป

โรค และสถานการณ์การระบาดของโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม

โรคในกุ้งขาวแวนนาไมที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ โรคจุดขาว (white spot syndrome) โรคไอเอชเอชเอ็น (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis; IHHN) โรคแคระแกร็น (hematopoietic necrosis; RDS) โรคทอร่า (taura syndrome) โรคกล้ามเนื้อตายติดต่อ (infectious myonecrosis; IMN) โรคหัวเหลือง (yellow head disease) โรคกุ้งตายด่วนหรือกลุ่มอาการตายด่วน (shrimp early mortality syndrome; EMS) หรือกลุ่มอาการตับและตับอ่อนตายเฉียบพลัน (acute hepatopancreatic necrosis syndrome; AHPNS) (Srisuvan, 2008)

โรคจุดขาวเกิดจากการติดไวรัส white spot syndrome virus (WSSV) อยู่ในสกุล *Whispovirus* วงศ์ *Nimaviridae*โดยกุ้งติดเชื้อจะแสดงอาการที่เนื้อเยื่อชั้นเอ็กโทเดิร์ม (ectoderm) และเมโซเดิร์ม (mesoderm) ประกอบไปด้วย ชั้นหนังกำพร้า เหงือก ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนปลาย ต่อมน้ำเหลือง อวัยวะสืบพันธุ์ อวัยวะขับถ่าย (antennal gland) เซลล์ต้นกำเนิดของเลือด (hematopoietic stem cells) และเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนเซลล์เยื่อบุของอวัยวะที่กำเนิดจากชั้นเอนโดเดิร์ม เช่น ตับร่วมตับอ่อน (hepatopancreas) (Reddy *et al*., 2013) อัตราการตายที่สูงจากการติดโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม (Wang *et al*., 2019) มีสาเหตุจากความไวต่อการติดเชื้อร่วมกับปัจจัยความเครียดจากสารก่อโรคอื่น ๆ หรือ สภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย กุ้งกลุ่มพีเนียดมีความไวสูงต่อการติดเชื้อส่งผลให้ความชุกของการเกิดโรคมีความแปรปรวนสูงตั้งแต่ 1% ในประชากรตามธรรมชาติที่ติดเชื้อไปจนถึง 100% ของประชากรในบ่อเลี้ยง (Lo and Kou, 1998) โรคจุดขาวถูกตรวจพบจากกลุ่มครัสเตเชียนในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียใต้ อินเดีย เมดิเตอร์เรเนียน ตะวันออกกลางและอเมริกา (Rodriguez-Anaya *et al*., 2016) อาการแสดงทางคลินิกโดยการสังเกตลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปประกอบด้วย มีพฤติกรรมเซื่องซึม หลังจากนั้นจะกินอาหารน้อยลง ขนาดแตกต่างกัน กุ้งจะว่ายรวมบริเวณขอบสถานที่เลี้ยง และภายใน 2-4 วันจากการปรากฏตัวจะพบการตายบริเวณขอบสถานที่เลี้ยง อัตราการป่วย และอัตราการตายสูง ลักษณะภายนอกพบว่ากุ้งมีจุดสีขาวบนเปลือกซึ่งเป็นอาการทางคลินิกทั่วไปของการติดเชื้อไวรัสจุดขาว (OIE, 2006)

หลักการการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง และระบบไหลเวียนเลือดเป็นแบบระบบเปิด (open circulatory system) มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunoglobulin) ไม่มีระบบการตอบสนองที่เป็นแบบอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) แต่พึ่งพาภูมิคุ้มกันที่มีตั้งแต่กำเนิด รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำในน้ำเลือด (humoral immunity) เพื่อจดจำและกำจัดผู้บุกรุกต่าง ๆ (Li *et al*., 2019) โดยสรุปแล้วกุ้งขาวแวนนาไมมีการตอบสนองภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคจุดขาว 3 ระบบ ได้แก่ 1) ระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (cellular immunity) ประกอบด้วยเซลล์ไฮยาลิน (hyaline cells) เซลล์เซมิแกรนูล (semi-granular cells) และเซลล์แกรนูล (granular cells) อาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่สามารถเข้าสู่ร่างกาย (Smith and Soderhall, 1993 ; Hannon, 2002) 2) ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) มีการทำงาน

โดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ช่วยในการจดจำ และเข้าจับกับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) (Wang and Wang, 2013) 3) ระบบการยับยั้งอาร์เอ็นเอ (RNA interference) ซึ่งมีบทบาทในการต้านเชื้อไวรัสตามธรรมชาติ (Labreuche and Warr, 2013) เป็นการตอบสนองทางชีวภาพผ่านการรับรู้ของอาร์เอ็นเอสายคู่เป็นการยับยั้งกระบวนการแสดงออกของยีน และการสร้างโปรตีนเป้าหมายภายในเซลล์ (post-transcriptional gene silencing) ซึ่งเป็นตัวกลางที่ต้านทานต่อปรสิตภายในและกรดนิวคลิอิกของเชื้อจากภายนอก และควบคุมการแสดงออกของยีนที่เข้ารหัสโปรตีน (Hanon, 2002; Geley and Muller, 2004) ในส่วนของระบบภูมิคุ้มกัน RNAi ได้ถูกนำไปใช้สำหรับการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) ผ่านรูปแบบของการพัฒนาวัคซีน (Syed Musthahq and Kwang, 2014)

จากความรู้ด้านระบบภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่นำมาประยุกต์ใช้สำหรับการป้องกันมากกว่าการรักษา เนื่องจากอัตราการตายจากการเป็นโรคจุดขาวของกุ้งขาวแวนนาไมสูงมากกว่า 80% (National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards, 2007) โดย Nilsen *et al*. (2017) ศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยนำเอา VP28 ซึ่งเป็นโปรตีนบนพื้นผิวของไวรัสโรคจุดขาวมาทำหน้าที่เสมือนเป็น RNAs สายคู่ (dsRNA) เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์ siRNA เพื่อใช้ในกระบวนการยับยั้งอาร์เอ็นเอ (RNAi) นำไปสู่กระบวนการยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัสตั้งแต่กระบวนการถอดรหัสของ mRNA ซึ่งรูปแบบของการใช้ VP28 เช่น การให้กินสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีโปรตีนห่อหุ้มไวรัส VP28 ซึ่งส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 87% (Kiataramgul *et al*., 2020)

วิธีการตรวจหาและวินิจฉัยโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับผลกระทบจากโรคจุดขาวในช่วงแรกของการติดเชื้อมักไม่แสดงอาการผิดปกติหรือรอยโรคที่บ่งชี้ เกิดความล่าช้า และคลาดเคลื่อนส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยง (National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards, 2007) จากการกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ได้กำหนดเรื่องของการชันสูตรโรคจุดขาวในกุ้ง คือ การตรวจด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา และการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยที่ดีควรสามารถยืนยันการติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว มีความไวและจำเพาะต่อโรค ราคาถูก และเหมาะสมต่อการใช้งาน

1. **การตรวจด้วยวิธีดั้งเดิม** (Conventional method)

การตรวจมหพยาธิวิทยา (gross pathology) เป็นวิธีหนึ่งในการตรวจด้วยวิธีดั้งเดิม โดยสังเกตลักษณะภายนอก ร่วมกับอาการทางคลินิกมีอัตราการป่วย และอัตราการตายสูง หรือใช้การตรวจเนื้อเยื่อหลังจากย้อมด้วยสีย้อม แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั้งแบบใช้แสง (light microscope) หรือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy: TEM) เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของโรคด้วยโดยใช้เนื้อเยื่อสดของส่วนที่เป็นรอยโรค ซึ่งเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะพบลักษณะของนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ (hypertrophied) และเห็นการติดสีแดงก่อน (Cowdry A-type inclusions) (National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards, 2007) สำหรับเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาด้วยวิธีการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ตรวจพบการติดสีน้ำเงิน โดยพบ intranuclear inclusion bodies ในอวัยวะเป้าหมายหลายอวัยวะ เช่น เนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร เนื้อเยื่อฮีมาโตปอยอีติก (hematopoietic tissue) เหงือก อวัยวะลิมฟอยด์ (lymphoid organ) (Badhul Haq *et al.,* 2015) และหากใช้กล้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านนำมาใช้ในสังเกตรอยโรคและการสร้างภาพของไวรัส โดย Hipolito *et al.* (2012) รายงานว่า หากด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าร้อยละ 90 ของตัวอย่างที่เป็นโรคจำขาว จะตรวจพบรูปร่างของไวรัสรูปร่างเป็นวงรี (avoid shape) มีความยาว 230-290 นาโนเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 80-160 นาโนเมตร นอกจากนั้นยังประยุกต์ใช้ TEM ร่วมกับการตรวจด้วยแอนติเจน-แอนติบอดีที่เรียกว่า

immunoelectron microscopy (IEM) โดยอาศัยแอนติบอดีของโปรตีน VP664 โดยพบว่าร้อยละ 90 ของตัวอย่างที่เป็นโรคจุดขาวมีอนุภาครวมที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและไวรัส (antibody-virus aggregate) (Hipolito *et al*., 2012) เทคนิคนี้นำมาใช้ในการตรวจหาไวรัสได้หลายชนิดทั้ง paramyxovirus retrovirus และ coronavirus (Catroxo *et al*., 2010) ส่วนวิธีการตรวจทางระบบภูมิคุ้มกัน (Immunocytochemistry) โดยอาศัยหลักการการเกิดแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น western blot analysis, immunodot assay, indirect fluorescent antibody test (IFAT), immunohistochemistry (IHC) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Sithigorngul *et al*., 2006; Yoganandhan *et al*., 2004) นอกจากนี้มีวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เซลล์จากอวัยวะน้ำเหลือง รังไข และเม็ดเลือด แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถวัดปริมาณของเชื้อโดยวิเคราะห์จากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cytopathic effect) และการตายของเซลล์ เพื่อกำหนดจุดสิ้นสุดการติดเชื้อของเซลล์ที่เพาะเลี้ยง (tissue culture infectivity dose; TCID50) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ พบว่าความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนและองค์ประกอบของสารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันทำให้ยากต่อการนำมาปฏิบัติ (Assavalapsakul *et al.,* 2003; Jiang *et al.,* 2006)

2. การตรวจด้วยวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ (Molecular diagnostics)

การตรวจด้วยสารเรืองแสง (Fluorescence in-situ hybridization; FISH)

เป็นวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะในเซลล์ที่แสดงอาการหรือสงสัยการติดเชื้อโดยอาศัยดีเอ็นเอโพรบ (DNA-probe) ที่มีขนาดประมาณ 50-100 นิวคลีโอไทด์ และติดสารเรืองแสงที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุเอาไว้ที่โพรบ ซึ่งโพรบจะเข้าไปจับกับกรดนิวคลิอิกเป้าหมายที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับดีเอ็นเอโพรบภายในเซลล์ ในการแปลผลนั้นให้พิจารณาจากการปรากฏของสีที่ติดฉลากไว้บนโพรบซึ่งต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescent microscope (Nunan and Lightner, 1997) โดยกุ้งขาวที่มีการติดเชื้อไวรัส WSSV จะปรากฏตะกอนเป็นสีน้ำเงินเข้มถึงดำ หากผลเป็นลบตะกอนมีสีเหลืองถึงน้ำตาล นอกจากการวินิจฉัยเชื้อไวรัสแล้ว FISH ยังใช้ในการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อตับ ลำไส้ และน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง (Jirattiwarutkul, 2007) ซึ่ง FISH เป็นวิธีที่มีความไวและจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามไม่เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคหรือความผิดปกติของลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นกว่า 20 กิโลเบส ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธี PCR ที่สามารถวิเคราะห์ความผิดปกติในระดับพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะเจาะจงและมีความไวสูงมาก (Siriboonpiputtana *et al*. 2017)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสแบบเนสเต็ด (Nested PCR)

เป็นวิธีการตรวจสอบที่เป็นมาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับ (gold standard) ที่ OIE (2006) แนะนำให้ใช้ในการตรวจ WSSV ในกุ้ง โดยการตรวจขั้นแรกทำการสกัดดีเอ็นเอ หลังจากนั้นทำตามขั้นตอน first-step PCR และ second step of the (nested) PCR ตามลำดับ ซึ่งอาศัยไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ดังแสดงใน Table 1 การอ่านผลโดยวิธีการเจลอิเลคโตรโฟลิซิส แล้วนำไปอ่านผลภายใต้แสงยูวี โดยเทียบกับแถบตัวบ่งชี้ แถบควบคุม และแถบตัวอย่าง ผลลัพธ์ที่เป็นบวกในขั้นตอนแรกของเกณฑ์วิธีมาตรฐานหมายถึง การติดเชื้อไวรัสโรคจุดขาวรุนแรง ในขณะที่เมื่อได้รับผลลัพธ์เป็นบวกในขั้นตอนที่สองเท่านั้น แสดงว่าเป็นการติดเชื้อแฝงหรือพาหะ (Nunan and Lightner, 2011) นอกจากการอ่านผลภายใต้แสงยูวีหรืออ่านผลด้วยแถบดีเอ็นเอแล้ว ผลผลิต PCR ยังสามารถประเมินด้วยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ทำให้การอ่านผลง่ายและสะดวกขึ้นโดยเฉพาะในกรณีการวิเคราะห์นอกห้องปฏิบัติการ โดยใช้เวลาในกระบวนการประมาณ 60 นาที (Kono *et al*., 2004) โดยหลังจากได้ผลผลิต PCR จากขั้นตอนปกติแล้ว ให้นำเข้าสู่เทคนิค LAMP ซึ่งการแปลผลสามารถพิจารณาจากความขุ่นจากตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate โดยนำหลอดทดสอบไปปั่นให้ตกตะกอน ถ้าเกิดการเพิ่มขยายยีน จะพบตะกอนสีขาว นอกจากนั้นยังพิจารณาจากสีเรืองแสง โดยใช้สารฟลูออเรสเซนต์ เช่น SYBR Green I เติมหลังจากผ่านเทคนิค LAMP แล้ว ถ้ามีผลิตภัณฑ์

Table 1. The primers for molecular methods of white spot syndrome virus detection

Methods	Sequence 5'-3'	Product size (bp)	References
RPA	F: CATGGATGAAAACCTCCGCATTCCTGTGAC	124	Yang *et al.* (2014)
	R: CATCAGACTTTCCATTGCGGATCTTGATTTTG		
	Prob: TGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGA(BHQ1-dT) G(THF)C(FAM-dT)GATGTGTCCTTTGAC (phosphate)		
Nested-PCR	F1: ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	1447	Durand and Lightner (2002)
	R1: TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA		
	F2: GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA	941	
	R2: TACGGCAGCTGCTGGACCTTGT		
Duplex qPCR	WSSV-F: 'GCTGCCTTGCCGGAAATTA	-	Leal *et al.* (2014), Durand and Lightner (2002)
	WSSV-R; AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA		
	Prob-r: 6-carboxyfluorescein (FAM) at the 5'		
	Prob-q: BHQ1 at the 3'		
	IHHNV-F: TAC TCC GGA CAC CCA ACC A		
	IHHNV-R: GGC TCT GGC AGC AAA GGT AA		
	[1/]Prob-q: N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA)		
	[1/]Prob-r: 6-carboxyfluorescein (FAM) at the 5'		
PCR	F: AATGGTCCCGTCCTCATCTCA	71	Tsai *et al.* (2012)
	R: GCTGCCTTGCCGGAAATT		
qPCR	F: 'GCTGCCTTGCCGGAAATTA	-	Durand and Lightner (2002)
	R; AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA		
	Prob-r: 6-carboxyfluorescein (FAM) at the 5'		
	Prob-q: BHQ1 at the 3'		

[1/] BHQ1-dT: thymidine nucleotide carrying Blackhole quencher, THF: tetrahydrofuran spacer, FAM-dT: thymidine nucleotide carrying Fluorescein, phosphate: block elongation

เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้น (สีส้ม) ให้กลายเป็นสีเขียวเมื่อดูภายใต้แสง UV (302 nm) (Mori *et al.*, 2001)

Quantitative-PCR (qPCR)

เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พร้อมทั้งสามารถวัดปริมาณของสารพันธุกรรมโดยอาศัยการเรืองแสงของสีฟลูออเรสเซ็นต์ โดยมีหลักการคือเริ่มต้นด้วย mRNA แล้วเปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นนำเข้าขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การศึกษาในกุ้งมักใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนจีโนมของ WSSV (U50923) สำหรับการเป็น positive control และทดสอบความไวโดยเจือจางลง 10 เท่า ให้มีจำนวน copies ในช่วง 2 - $2x10^5$ copies ในการสร้าง standard curves และมักใช้โพรบ TaqMan และ FAM-BHQ1 (Durand and Lightner, 2002) ซึ่งเครื่อง real time PCR มีตัววัดการเรืองแสงของสีฟลูออเรสเซนต์อิสระ ระหว่างปฏิกิริยา DNA polymerase เป็นตัวที่ย่อยฉลากเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ให้หลุดออกจากไพรเมอร์กลายเป็นฟลูออเรสเซนต์อิสระ ซึ่งจำนวนสีฟลูออเรสเซนต์อิสระที่ตรวจวัดนั้นแปรผันกับปริมาณสารพันธุกรรม (Chou *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2009; Leal, 2013) ในการวินิจฉัยโรค WSSV ได้นำเทคนิค qPCR มาประยุกต์ใช้โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase เรียกเทคนิคนี้

ว่า recombinase polymerase amplification (RPA) ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถทำในขั้นตอนเดียวโดยลดขั้นตอนของการเตรียม cDNA นอกจากนั้นวิธี RPA ยังใช้อุณหภูมิ (32-42 °C) ซึ่งต่ำกว่าปฏิกิริยา PCR ทั่วไป ในการเพิ่มจำนวนหรือสังเคราะห์ DNA นั้นแสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้แม้อยู่ที่อุณหภูมิปกติ ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่รวดเร็วในการวินิจฉัยโรค (Piepenburg, 2006; Yang *et al*., 2014) การใช้เทคนิค qPCR ยังถูกพัฒนามาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีสาเหตุจากไวรัสในกุ้งได้พร้อมกันสองเชื้อ ด้วยเทคนิค duplex qPCR ซึ่งสามารถจำแนกการติดเชื้อ WSSV และ infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ในกุ้งขาวได้โดยใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในพลาสมิด เพียง 2-20 copies/ปฏิกิริยา และ $2x10^5$ copies/ปฏิกิริยา สำหรับการวินิจฉัย WSSV และ IHHNV ตามลำดับ ซึ่งถือว่าความไวและจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยในระดับสูง (Lael *et al*., 2014)

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

เป็นการตรวจวินิจฉัยในระดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัส โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (amplicon) จากขั้นตอนของ nested PCR มาจัดลำดับ โดยเริ่มจากทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เลือกจากอกาโรสเจลบริสุทธิ์ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่สามารถจำลองเข้าไปในพลาสมิดของเวคเตอร์ก่อนการจัดลำดับหลังจากนั้นขยายพลาสมิดลูกผสม และทำให้บริสุทธิ์เพื่อจัดลำดับดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อจัดลำดับชิ้นส่วนดีเอ็นเอเปรียบเทียบลำดับกับฐานข้อมูล basic local alignment search tool (BLAST) โดย OIE แนะนำการหาลำดับและการวิเคราะห์แอมพลิคอน จากวิธีการเจลอิเลคโตรโฟลิซิส แล้วนำไปอ่านผลภายใต้แสงยูวี (Claydon *et al*., 2004)

การเปรียบเทียบการตรวจและวินิจฉัยโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม

วิธีการวินิจฉัยโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม มีข้อดีและข้อเสียที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบที่แตกต่างกันรวมถึงความเหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยที่แตกต่างกันตามสถานการณ์ ประกอบด้วย การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น (Presumptive test) ใช้สำหรับงานภาคสนามจัดเป็นวิธีการวินิจฉัยที่ต้องการความสะดวก รวดเร็วและราคาถูก แต่การวินิจฉัยไม่มีความแม่นยำหากการติดเชื้อระดับต่ำ ได้แก่ วิธีการย้อมสีแบบรวดเร็วซึ่งใช้เนื้อเยื่อสดของส่วนที่แสดงรอยโรค ต่างกับการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาที่เนื้อเยื่อจะต้องผ่านกระบวนการเก็บรักษาให้คงสภาพมาก่อน จึงทำให้ความสะดวกและความรวดเร็วน้อยกว่าการใช้เนื้อเยื่อสด (National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards, 2007) ในขณะที่วิธีการตรวจหาแอนติเจน–แอนติบอดี เป็นวิธีที่มีราคาสูงขึ้นหากใช้ชุดทดสอบ (test kit) อีกทั้งมีความแม่นยำน้อยลงหากการติดเชื้อมีในระดับต่ำ จึงเหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคจุดขาวแบบเฉียบพลันเท่านั้น (OIE, 2018) นอกจากนั้นผลการตรวจยังให้บวกคล้ายกับเชื้อไวรัสอีกหลายชนิด (Catroxo *et al*., 2010) ส่วนการตรวจวินิจฉัยยืนยัน (confirmative test) ส่วนใหญ่มักเป็นวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ ซึ่งเหมาะสมกับการตรวจวินิจฉัยที่ต้องการความไวและจำเพาะต่อเชื้อสูงขึ้น ตรงกันข้ามทำให้ความสะดวกและความรวดเร็วในการวินิจฉัยลดลง แต่วิธีการดังกล่าวมีขั้นตอนยุ่งยากและใช้ระยะเวลานาน (Figure 1)

สำหรับการเปรียบเทียบระหว่างวิธี nested PCR ถึงแม้จะมีความไวและความจำเพาะในการตรวจเชื้อ WSSV แต่เนื่องจากต้องใช้ PCR สองครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอตามที่ต้องการ จึงใช้เวลาในการวินิจฉัยมากขึ้นและมีโอกาสให้ผลบวกที่ผิดพลาด (false positive) ได้เมื่อเทียบกับวิธี qPCR (Nunan and Lightner, 2011; Leal *et al*., 2014) หากเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะต่อโรคของวิธี qPCR พบว่า มีมากกว่า โดยพบว่าวิธี nested PCR จะมีความไว 100% เมื่อตัวอย่างมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากกว่า 150 ng ในขณะที่ qPCR ต้องการความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 ng ซึ่งเหมาะสมมากในการตรวจวินิจฉัยโรคจุดขาวในลูกกุ้งขาวตั้งแต่ลาวา ถึงระยะโพสต์ลาวา ซึ่งเป็นระยะที่มีการขนย้ายระหว่างฟาร์ม (Jang *et al*., 2009; Leal *et al*., 2014)

จะเห็นว่าความแม่นยำของวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคจะขึ้นอยู่กับระดับของเชื้อที่กุ้งได้รับแล้ว ยังมีปัจจัยเนื่องจากระยะต่าง ๆ ของกุ้งที่ติดเชื้อด้วย โดย OIE

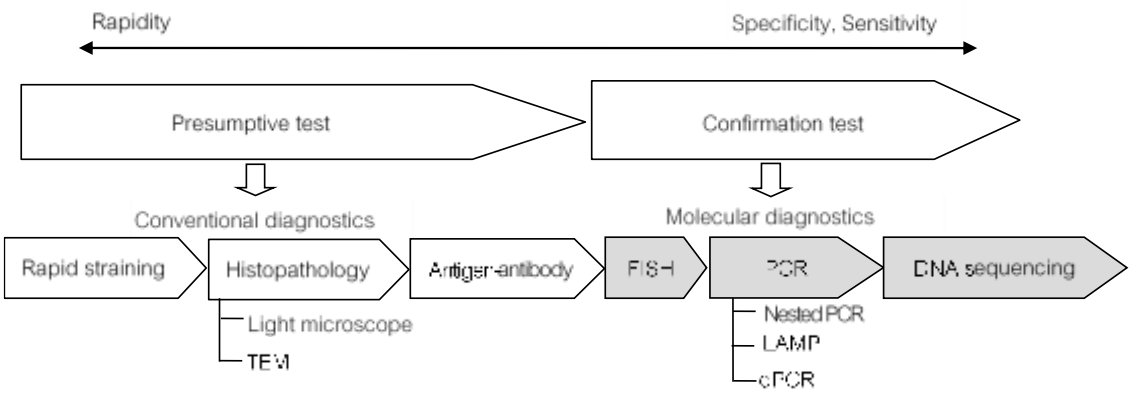

Figure 1. The summary of WSSV diagnostic methods in shrimp. Conventional diagnostic methods are usually for presumptive test, which emphasizes rapid results. Molecular methods are appropriate for confirmation test

(2018) ระบุว่าในกุ้งระยะลาวา(larvae) ไม่มีวิธีที่เหมาะสมต่อการวินิจฉัยเนื่องจากไม่มีความจำเพาะและไวต่อการติดเชื้อ ส่วนในระยะโพสต์ลาวา (Post larvae) การวินิจฉัยเบื้องต้นแนะนำวิธีทางจุลพยาธิวิทยาส่วนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสสามารถใช้วินิจฉัยเบื้องต้นและยืนยันได้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยที่ดี สะดวกและรวดเร็วในขณะที่กุ้งในระยะรุ่นและระยะตัวเต็มวัยเป็นระยะที่มีการพบอาการมากกว่าระยะอื่น (National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards, 2007) การวินิจฉัยเบื้องต้นแนะนำการสังเกตอาการทางคลินิก โดยหากป็นอาการแบบเฉียบพลัน พบอัตราการตาย 80-100% ในช่วง 1-5 วันหลังแสดงอาการ การตรวจมหพยาธิวิทยา พบลักษณะของจุดขาวที่เปลือกและการตรวจจุลพยาธิวิทยาพบ inclusion body ภายในนิวเคลียสหากเป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนแอนติบอดี ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสเทคนิค LAMP และ FISH สามารถใช้วินิจฉัยเบื้องต้นและยืนยันได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความจำเพาะในการวินิจฉัยที่ดี สะดวกและรวดเร็ว ส่วนการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน วิธีชีววิเคราะห์การเพาะเลี้ยงเซลล์ ไม่เหมาะในกุ้งทุกระยะเนื่องจากไม่สะดวกและมีความไวต่อเชื้อต่ำ

สรุป

แนวทางการตรวจวินิจฉัยโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม ควรมีความจำเพาะและไวต่อเชื้อ สะดวก และราคาถูก เหมาะสำหรับการตรวจเพื่อยืนยันได้ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายเชื้อในกลุ่มกุ้งพ่อแม่พันธุ์ และลดความเสียหายจากการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ วิธีที่เหมาะสมในการตรวจเมื่อสงสัยและต้องการวินิจฉัยการติดเชื้อโรคจุดขาวควรใช้วิธีมาตรฐานที่ยอมรับและแนะนำจาก OIE คือ วิธี nested PCR ในการวินิจฉัยเบื้องต้นและเป็นการยืนยัน เนื่องจากมีความไวและจำเพาะต่อเชื้อ สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคในระยะลูกกุ้ง ตั้งแต่ระยะลาวาถึงระยะโพสต์ลาวา ซึ่งเป็นระยะที่มีการขนย้ายระหว่างฟาร์ม วิธีที่เหมาะสมคือต้องมีวิธี qPCR เนื่องจากสามารถตรวจจากดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นเพียง 50 ng ในระดับฟาร์มเกษตรกรตรวจเมื่อสงสัยการเกิดโรคจุดขาวควรเริ่มที่การสังเกตอาการทางคลินิก และการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นใช้สำหรับงานภาคสนามที่ต้องการความสะดวก รวดเร็ว เช่น ใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปของการตรวจหาแอนติเจนแอนติบอดี จากนั้นจึงส่งตรวจในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางมหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และควรยืนยันการวินิจฉัยอีกครั้งด้วยวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์อื่น ๆ ที่ง่าย เช่น เทคนิค LAMP และ FISH ส่วนวิธีชีววิเคราะห์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นวิธีที่ไม่แนะนำเนื่องจากการป้องกันการปนเปื้อนและการกระจายของโรคค่อนข้างยาก

ในการตรวจวินิจฉัยโรคจุดขาวในกุ้งขาวแวนนาไม ควรมีการตรวจตัวชี้วัดทางชีวภาพที่จำเพาะและไวต่อเชื้อสูง อีกทั้งคงอยู่ได้นานพอที่จะสามารถตรวจได้ เพื่อใช้ในการประเมินความรุนแรง และความเสียหายที่จะเกิดขึ้น ร่วมกับวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์อื่น ๆ มีการตรวจความต้านทานของกุ้งเพื่อนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์และในอนาคตอาจมีการพัฒนาวัคซีนสำหรับการป้องกันโรคจุดขาวที่ใช้เชิงพาณิชย์ ทั้งในรูปแบบการฉีดและการกินเพื่อลดความสูญเสียหากเกิดการระบาดของโรค

เอกสารอ้างอิง

Assavalapsakul, W., D.R. Smith and S. Panyim. 2003. Propagation of infectious yellow head virus particles prior to cytopathic effect in primary lymphoid cell cultures of *Penaeus monodon*. Diseases of Aquatic Organisms 55(3): 253-258.

Badhul Haq, M.A., K. Durgadevi, M.N. Banu, A.S. Ahamed, C. Tiwary and M. Srinivasan. 2015. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in southern India using PCR, SEM and histological techniques. Indian Journal of Biotechnology 14: 369-375.

Catroxo, M.H.B., D.L. Taniguchi, N.A. Melo, L. Milanelo, S. Petrella, M. Alves, A.M.C.R.P.F. Martins and M.M. Rebouças. 2010. Viral research in Brazilian owls (*Tyto alba* and *Rhinoptynx clamator*) by transmission electron microscopy. International Journal of Morphology 28(2): 627-636.

Chou, R., A. Qaseem, D.K. Owens and P. Shekelle. 2011. Diagnostic imaging for low back pain: advice for high-value health care from the American College of Physicians. Annals of Internal Medicine 154(3): 181-189.

Claydon, K., B. Cullen and L. Owens. 2004. OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. Diseases of Aquatic Organisms 62(3): 265-268.

Durand, S.V and D.V. Lightner. 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. Journal of Fish Diseases 25(7): 381-389.

FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018; Meeting the Sustainable Development Goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Geley, S. and C. Müller. 2004. RNAi: ancient mechanism with a promising future. Experimental Gerontology 39(7): 985-998.

Hannon, G.J. 2002. RNA interference. Nature 418(6894): 244-251.

Hipolito, M., M.H.B. Catroxo, A.M.C.R.P.F. Martins, N.A. Melo, E.M. Pituco, N.T.C. Galleti, M.J.T. Ranzani-Paiva, J.L.P. Mouriño and C.M. Ferreira. N. 2012. Detection of white spot syndrome virus in brazil using negative staining, immunoelectron microscopy and immunocytochemistry techniques. International Journal of Morphology 30(2): 761-768.

Jang, A.C.C, Y.-C. Chang, J. Bai and D. Montell. 2009. Border-cell migration requires integration of spatial and temporal signals by the BTB protein Abrupt. Nature Cell Biology 11(5): 569–579.

Jiang, Y.S., W.B. Zhan, S.B. Wang and J. Xing. 2006. Development of primary shrimp hemocyte cultures of *Penaeus chinensis* to study white spot syndrome virus (WSSV) infection. Aquaculture 253(1): 114-119.

Jirattiwarutkul, W. 2007. Application of cecropin D for controllinf of luminescent bacteria in

Litopenaeus vannamei Boone. M.S. Thesis. Thaksin University, Songkhla. 97 p. (in Thai)

Kiataramgul, A., S. Maneenin, S. Purton, N. Areechon, I. Hirono, T.W. Brocklehurst and S. Unajak. 2020. An oral delivery system for controlling white spot syndrome virus infection in shrimp using transgenic microalgae. Aquaculture 521: 735022, doi: 10.1016/j.aquaculture. 2020.735022.

Kono, T., R. Savan, M. Sakai and T. Itami. 2004. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Virological Methods 155(1): 59-65.

Labreuche, Y. and G.W. Warr. 2013. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. Fish & Shellfish Immunology 34(4): 1002-1010.

Leal, C.A.G, A.F. Carvalho, R.C. Leite and H.C.P. Figueiredo. 2014. Development of duplex real-time PCR for the detection of WSSV and PstDV1 in cultivated shrimp. BMC Veterinary Research 10(1):150, doi: 10.1186/1746-6148-10-150.

Leal, W.S. 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins and degrading enzymes. Annual Review of Entomology 58(1): 373-391.

Li, C., S. Weng and J. He. 2019. WSSV–host interaction: host response and immune evasion. Fish & Shellfish Immunology 84: 558-571.

Lo, C.F. and G.-H. Kou. 1998. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. Fish Pathology 33(4): 365-371.

Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita and T. Notomi. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochemical and Biophysical Research Communications 289(1): 150-154.

National Bureau of Agriculture Commodity and Food Standards. 2007. Diagnotic test of white spot disease in shrimp. (Online). Avaliable: http://www.acfs.go.th/standard/download/std_diagnotic_spot_shrimp (old_not_complete). pdf (April 29, 2019). (in Thai)

Nilsen, P., M. Karlsen, K. Sritunyalucksana and S. Thitamadee. 2017. White spot syndrome virus VP28 specific double-stranded RNA provides protection through a highly focused siRNA population. Scientific Reports 7: 1028, doi: 10.1038/s41598-017-01181-w.

Nunan, L.M. and D.V. Lightner. 1997. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Virological Methods 63(1): 193-201.

Nunan, L.M. and D.V. Lightner. 2011. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). Journal of Virological Methods 171(1): 318-321.

OIE. 2006. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office International Des Epizooties, Paris.

OIE. 2018. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office International Des Epizooties, Paris.

Piepenburg, O., C.H. Williams, D.L. Stemple and N.A. Armes. 2006. DNA detection using recombination proteins. PLoS Biology 4(7): e204, doi: 10.1371/journal.pbio.0040204.

Raddy, A.D., G. Jeyasekaran and R.J. Shakila. 2013. Morphogenesis, pathogenesis, detection

and transmission risks of white spot syndrome virus in shrimps. Fisheries and Aquaculture Journal 4, article ID: FAJ, doi: 10.4172/2150-3508.1000066.

Rodriguez-Anaya, L.Z., J.R. Gonzalez-Galaviz, R. Casillas-Hernandez, F. Lares-Villa, K. Estrada, J.C. Ibarra-Gamez and A. Sanchez-Flores. 2016. Draft genome sequence of white spot syndrome virus isolated from cultured *Litopenaeus vannamei* in Mexico. Genome Announcements 4(2): 01674-1715, doi: 10.1128/genomeA.01674-15.

Siriboonpiputtana, T., N. Limsuwanachot and B. Rerkamnuaychoke. 2017. Genetic techniques for diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia. Journal of Science and Technology 25(5): 854-869. (in Thai)

Sithigorngul, W., S. Rukpratanporn, N. Pecharaburanin, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and P. Sithigorngul. 2006. A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. Diseases of Aquatic Organisms 72(2): 101-106.

Smith, V.J. and K. Soderhall. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. Cell and Tissue Research 233(2): 295-303.

Srisuvan, T. 2008. Manual for detection and diagnosis of marine shrimp. National Institute of Animal Health Journal 3(2): 81-126. (in Thai)

Syed Musthaq, S.K. and J. Kwang. 2014. Evolution of specific immunity in shrimp - A vaccination perspective against white spot syndrome virus. Developmental and Comparative Immunology 46(2): 279-290.

Tokrisna, R., K. Kuldilok, K. Boonchuwong, B. Khongkhon and T. Mawongwai. 2015. Thai Aquaculture Status in the Context of the ASEAN Economic Community. Zeno Publishing and Packaging Co., Ltd., Bangkok. 128 p. (in Thai)

Tsai, Y.-L., Y.-C. Lin, P.H. Chou, P.H. Teng and P.Y. Lee. 2012. Detection of white spot syndrome virus by polymerase chain reaction performed under insulated isothermal conditions. Journal of Virological Methods 181(1): 134-137.

Wang, J., Y. Huang, K. Xu, X. Zhang, H. Sun, L. Fan and M. Yan . 2019. White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 84:130-137.

Wang, X.W., and J.X. Wang. 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. Fish & Shellfish Immunology 34: 981-989.

Yang, X., B.-J. Ma, C.L. Chang and C.-J. Shieh. 2014. Effects of workload on burnout and turnover intention of medical staff: a study. Studies on Ethno-Medicine 8(3): 229-237.

Yoganandhan, K., S. Syed Musthaq, R.B. Narayanan and A.S. Sahul Hameed. 2004. Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. Journal of Fish Diseases 27(9): 517-522.