

การศึกษาทางพยาธิวิทยา และอณูชีววิทยาของเชื้อ infectious spleen and kidney  
necrosis virus ในปลากระพงขาวเลี้ยง (*Lates calcarifer*)

Pathological and molecular studies on infectious spleen and kidney necrosis  
virus in cultured barramundi (*Lates calcarifer*)

ภุริดา ศรีพิพัฒน์กุล\* ทวีวัฒน์ ตีมะการ สมจิตร รุจิขวัญ เจษฎา รัตโณภาส

Phurida Sripipattanakul\* Taweewat Deemagarn Somjit Rujikwan Jedsada Ratthanophart

ABSTRACT

**Background:** Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) is one of viruses causing Red sea bream iridoviral disease (RSIVD), resulting in loss of barramundi farming due to mass mortalities of juvenile barramundi. In Thailand, the study of this disease is limited. The aim of the study is to describe pathological and molecular characteristics of this virus from naturally infected juvenile barramundi in farms in order to gain knowledge for fast and accurate diagnosis leading to disease control and protection.

**Methods:** Thirty juvenile barramundi samples aged 1-2.5 months that showed typical lesion of RSIVD were collected from confirmed 2 RSIVD infected culture farms in Nakhon Pathom during August 2018-April 2019. The samples were subjected to pathological study, including gross pathological, histopathological and ultrastructural studies, and molecular study comprised virus detection by PCR, species confirmation by nucleotide sequencing and genetic relationship analysis by phylogenetic tree reconstruction.

**Results:** Gross pathology revealed hyperpigmentation, abdominal distention, exophthalmos, pale gills and pale liver with multifocal hemorrhage in all samples. Histopathological study found pathognomonic lesions in spleen and kidney. A large number of IBC were observed with necrosis and degeneration of tissues in the organs. Ultrastructural study found icosahedral virions, with a diameter of approximately 165-210 nm, were visualized inside the cytoplasm of IBC. Molecular study found that PCR product sizes of all samples were approximately 570 bp and nucleotide sequences of all samples were identical, which had a high percentage of nucleotide sequence identity of 99.81% to the virus strain ISKNV. Furthermore, the phylogenetic tree showed that ISKNV found in this study were classified into the group of ISKNV strain.

**Conclusions:** The pathological study results revealed the pathognomonic lesion of cultured juvenile barramundi infected with ISKNV was IBCs that were found in hematopoietic tissue of spleen and kidney. The molecular study results confirmed the pathogen was the virus strain ISKNV which had a high percentage of nucleotide sequence identity to the ISKNV that was reported in outbreaks in Thailand.

**Keywords:** ISKNV, barramundi, *Lates calcarifer*, pathology, molecular biology

National Institute of Animal Health, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900 Thailand

\*Corresponding author: Tel. 0-2579-0570 Fax. 0-2579-8918 E-mail: xuaiya55@gmail.com

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900 ประเทศไทย

\*\*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ: โทร 0-2579-0570 โทรสาร 0-2579-8918 E-mail: xuaiya55@gmail.com

## บทคัดย่อ

**ที่มาของการศึกษา:** Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) เป็นหนึ่งในสาเหตุของ Red sea bream iridoviral disease (RSIVD) ทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวจากการตายของลูกปลาเป็นจำนวนมาก ในประเทศไทยยังไม่มีวิธีควบคุมและป้องกันโรคที่ได้ผล อีกทั้งรายงานเกี่ยวกับโรคนี้อยู่มีจำกัด การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยา และอนุชีววิทยาของไวรัสในลูกปลากะพงขาวที่ติดเชื้อในฟาร์มเพาะเลี้ยง สำหรับเป็นองค์ความรู้ในการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำ อันจะนำไปสู่การควบคุม และป้องกันโรคต่อไป

**วิธีการ:** รวบรวมตัวอย่างลูกปลากะพงขาวเลี้ยงอายุ 1-2.5 เดือน จำนวน 30 ตัว ซึ่งแสดงรอยโรคของ RSIVD จากฟาร์มเพาะเลี้ยง 2 แห่งในจังหวัดนครปฐม ที่ได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อระหว่างเดือนสิงหาคม 2561 ถึง เมษายน 2562 มาศึกษาทางพยาธิวิทยาประกอบด้วย การศึกษารอยโรคทางมหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน และศึกษาทางอนุชีววิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR จากนั้นนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree

**ผล:** การศึกษาทางมหพยาธิวิทยาพบลูกปลาทุกตัวมีลำตัวสีเข้มขึ้น ท้องบวม ตาโปน เหงือกซีด และดับซีดร่วมกับพบจุดเลือดออก การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคจำเพาะคือ inclusion body-bearing cell (IBC) ปริมาณมากที่สุดในม้ามและไต โดยพบการตายและการเสื่อมของอวัยวะดังกล่าวในทุกตัวอย่าง และการศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าโครงสร้างภายใน IBC มีอนุภาคของไวรัสที่มีรูปร่างแบบ icosahedral ขนาดประมาณ 165-210 nm ในบริเวณไซโตพลาสซึม สำหรับการศึกษาทางอนุชีววิทยาพบว่า PCR product ของทุกตัวอย่างมีขนาดประมาณ 570 bp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมด และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV สูงถึง 99.81% นอกจากนี้แผนภูมิ phylogenetic tree

แสดงให้เห็นว่า ISKNV ที่พบในการศึกษานี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ strain ISKNV

**สรุป:** ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาในลูกปลากะพงขาวเลี้ยงในครั้งนี้นำพบรอยโรคจำเพาะของการติดเชื้อ strain ISKNV คือการพบ IBC ที่ hematopoietic tissues ในม้ามและไต และผลการศึกษาทางอนุชีววิทยายืนยันว่าเชื้อก่อโรคในครั้งนี้เป็น strain ISKNV ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ strain ที่มีรายงานการระบาดในประเทศไทย

**คำสำคัญ:** ISKNV ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* พยาธิวิทยา อนุชีววิทยา

## บทนำ

Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) เป็นเชื้อไวรัสชนิด double-stranded DNA ซึ่งถูกจัดเป็น strain หนึ่งใน species ISKNV สกุล *Megalocytivirus* วงศ์ *Iridoviridae* ตามรายงานครั้งที่ 10 ของ International Committee on Taxonomy of Viruses เมื่อปี พ.ศ. 2560 ได้จำแนกเชื้อในสกุล *Megalocytivirus* ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการศึกษาทางซีรัมวิทยา พบว่า species ISKNV ประกอบด้วยหลาย strain เช่น strain ISKNV และ red sea bream iridovirus (RSIV) เป็นต้น (Chinchar *et al.*, 2017) ISKNV และ RSIV เป็นไวรัสที่ก่อ red sea bream iridoviral disease (RSIVD) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายเป็นจำนวนมากในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาในหลายประเทศโดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดย ISKNV พบรายงานก่อโรคทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเล ขณะที่ RSIV พบรายงานส่วนใหญ่ในปลาทะเล (OIE, 2019) รอยโรคจำเพาะ (pathognomonic lesion) ของการติดเชื้อไวรัสในสกุลนี้คือ inclusion body-bearing cell (IBC) ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสกระตุ้นให้เซลล์เนื้อเยื่อที่ติดเชื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophy) และภายในไซโตพลาสซึมมี basophilic granular inclusions ขนาดใหญ่ที่เบียดนิวเคลียส สำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รูปร่างของ

ISKNV เป็นแบบ icosahedral ที่มีเปลือกหุ้ม และพบอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (Chinchar *et al.*, 2017)

RSIVD เป็นโรคที่ก่อให้เกิดภาวะโลหิตจางรุนแรงในปลาหลายชนิด จากการทำลายเนื้อเยื่อในระบบการสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue) ของปลา ซึ่งพบส่วนใหญ่ในม้ามและไต (Kawato *et al.*, 2017) ปลาเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลกไวต่อการเกิดโรค เช่น กลุ่มปลากระพง และปลาเก๋า เป็นต้น โดยในลูกปลาระยะ juvenile จะมีความไวต่อการเกิดโรคมกกว่าปลาเต็มวัย การติดต่อของโรคส่วนใหญ่เป็นแบบ horizontal transmission ผ่านทางน้ำ (OIE, 2019) ขณะที่ความเสี่ยงในการติดต่อแบบ vertical transmission ผ่านทางไข่หรือสเปิร์มอยู่ในระดับต่ำ (Kawato *et al.*, 2017) สำหรับการวินิจฉัยโรค OIE (2019) มีหลายวิธี ได้แก่ การวินิจฉัยจากอาการ การวินิจฉัยทางคลินิกด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา ได้แก่ มหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการวินิจฉัยหาเชื้อก่อโรค เช่น วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่จำเพาะต่อ ISKNV และ RSIV ซึ่งพัฒนาโดย Kurita *et al.* (1998) โดยสามารถนำ PCR product มาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) ได้ (Mohr *et al.*, 2015)

ในประเทศไทย RSIVD เป็นโรคระบาดในสัตว์น้ำตามพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2558 ที่ยังไม่มีวิธีการรักษา และไม่มีวัคซีน ทำให้การควบคุมโรคทำได้ยาก มีรายงานก่อความเสียหายในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปลานิล (Suebsing *et al.*, 2016) ปลาทรายงาม (Baoprasertkul and Kaenchan, 2019) และปลากระพง โดยเฉพาะในปลากระพงขาว (Thanasaksiri *et al.*, 2019; Kerddee *et al.*, 2021) ซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจสำคัญที่กรมประมงส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะเลี้ยง โดยใน พ.ศ. 2560 มีเนื้อที่เพาะเลี้ยงมากกว่า 12,800 ไร่ และมีมูลค่าจากการเพาะเลี้ยงมากกว่า 2,600 ล้านบาทต่อปี (นเรศ, 2562) แต่การศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้ในปลากระพงขาวยังจำกัดโดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับการก่อโรค และลักษณะทางอนุชีววิทยา (Thanasaksiri

*et al.*, 2019; Kerddee *et al.*, 2021) การศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษามหพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้ทราบถึงรอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่า การเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ และการบ่งชี้ลักษณะของเชื้อไวรัสก่อโรคในปลาที่ติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาทางอนุชีววิทยาเพื่อยืนยัน strain ของเชื้อจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรม สำหรับเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของประเทศไทย เพื่อเพิ่มองค์ความรู้ทำให้มีการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำอันนำไปสู่การควบคุม และป้องกัน เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่าง

ลูกปลากระพงขาวอายุ 1-2.5 เดือน จำนวน 30 ตัว ที่แสดงรอยโรคของ RSIVD ระหว่างเดือนสิงหาคม 2561 ถึง เมษายน 2562 จาก 4 บ่อ ของฟาร์มเพาะเลี้ยง 2 แห่งในจังหวัดนครปฐมที่ได้ผ่านการตรวจหาเชื้อก่อ RSIVD ด้วยวิธี PCR (Kurita *et al.*, 1998) จากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติแล้ว จากนั้นทำการกำหนดเลขที่ตัวอย่างตามสถานที่เลี้ยง และช่วงเวลาที่พบโรค เพื่อนำมาศึกษาทางพยาธิวิทยา และทางอนุชีววิทยา (ตารางที่ 1)

### การศึกษาทางพยาธิวิทยา

#### การศึกษาทางมหพยาธิวิทยา

บันทึกรอยโรคจากลักษณะภายนอกที่พบของลูกปลากระพงขาวทั้ง 30 ตัวก่อนการผ่าซาก บันทึกรอยโรคที่พบจากอวัยวะของทุกตัวอย่าง

#### การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

ทำการผ่าซาก เก็บอวัยวะ ได้แก่ สมอง เหงือก หัวใจ ม้าม ไต ลำไส้ ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) จากลูกปลากระพงขาวที่ผ่าซากแล้วจำนวน 12 ตัว มา fixed ด้วย 10% buffered formalin ผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อและย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin โดยประยุกต์จากวิธีของ Luna (1968) จากนั้นตรวจรอยโรคทาง

จุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง และกำหนดเกณฑ์ระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา จากค่าเฉลี่ยของรอยโรคที่พบต่อ 1 สไลด์ ดังนี้ 1-25% = ระดับ mild, มากกว่า 25-50% = ระดับ moderate และมากกว่า 50-100% = ระดับ severe

#### การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

คัดเลือกตัวอย่างอวัยวะใน 10% buffered formalin ที่มีผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคจำเพาะ คือ IBC ปริมาณมากจากทุกบ่อ บ่อละ 1 ตัวอย่าง รวม 4 ตัวอย่าง โดยนำมาล้างด้วย phosphate buffer แล้ว fixed ในน้ำยา 1% osmium tetroxide ผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ แล้วตัด ultrathin-section ให้หนาประมาณ 100 nm ย้อมด้วยสี lead citrate และ uranyl acetate ซึ่งประยุกต์จากวิธีของเวคิน (2524) จากนั้นตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น HT7700 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan)

#### การศึกษาทางอนุชีววิทยา

##### การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างลูกปลากะพงขาว มาเก็บตัวอย่างอวัยวะ ได้แก่ หัวใจ ม้าม ไต ลำไส้ ตับและตับอ่อน โดยรวมอวัยวะจากลูกปลากะพงขาวบ่อเดียวกันเป็น 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) จนได้ตัวอย่างอวัยวะทั้งหมด 4 ตัวอย่าง

##### การสกัดสารพันธุกรรม

นำอวัยวะของลูกปลากะพงขาวจำนวน 4 ตัวอย่าง มาสกัดสารพันธุกรรมชนิด DNA โดยการบดรวมอวัยวะ

จากนั้นนำมาสกัดด้วยชุดสกัด DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต เก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

#### การตรวจหา DNA ของเชื้อก่อ RSIVD ด้วยวิธี PCR

นำตัวอย่าง DNA จำนวน 4 ตัวอย่างที่สกัดได้ มาตรวจหาเชื้อที่ทำให้เกิด RSIVD ด้วยวิธี PCR (OIE, 2019) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อบริเวณ 959-bp *Pst*I restriction fragment ของเชื้อ คือ forward primer 1-F (5'-CTCAAACACTCTGGCTCATC-3') และ reverse primer 1-R (5'-GCACCAACACATCTCCTATC-3') ซึ่งให้ PCR product ขนาด 570 bp (Kurita *et al.*, 1998) มีขั้นตอน คือ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 2X GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, USA) 25 µl, forward และ reverse primers อย่างละ 0.2 µM และเติม Dnase/Rnase-free distilled water (Invitrogen, USA) จนครบ 47 µl จากนั้นเติม DNA template ที่สกัดได้ 3 µl จากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้ ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ยี่ห้อ Applied Biosystems รุ่น Veriti<sup>™</sup> 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) โดยใช้ PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่ 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 58°C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 7 นาที นำ PCR product ที่ได้ ไปแยกขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel จากนั้นย้อม gel ด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml นาน 30 นาที เพื่อวิเคราะห์ขนาดของ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดข้อมูลของตัวอย่างลูกปลากะพงขาวและวิธีที่ใช้ในการศึกษา

Sample no.	Farm	Pond	Date of collection	Age (month)	Number of fish samples			
					Pathological study			Molecular study
					Gross	Histopathology	Ultrastructure	
1	A	1	8/2561	1	9	4	1	4
2	B	1	8/2561	2	3	1	1	1
3	B	2	9/2561	2.5	10	4	1	5
4	B	3	4/2562	1.5	8	3	1	4
Total					30	12	4	14

transilluminator ยี่ห้อ WEALTEC รุ่น Dolphin-DOC (WEALTEC, USA) โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder (Invitrogen, USA) และใช้ DNA ของ RSIV ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเป็นตัวอย่างควบคุม และใช้ Dnase/Rnase-free distilled water (Invitrogen, USA) เป็นตัวควบคุมลบ

### การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยตัด agarose gel บริเวณที่มีแถบ PCR product ขนาด 570 bp มาทำให้ PCR product

บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยา GenepHlow™ Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต แล้วนำมาเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse โดยใช้ไพรเมอร์ 1-F และ 1-R ตามลำดับร่วมกับชุดน้ำยา BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) จากนั้นทำให้ DNA sequencing product บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยา ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research, USA) แล้วนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ยี่ห้อ Applied Biosystems

ตารางที่ 2 ข้อมูลของเชื้อไวรัสใน species ISKNV ที่ใช้ในการศึกษานี้ (สืบค้นเมื่อ 31 กรกฎาคม 2564)

Virus strain	Host species	Geographic origin	Year	GenBank accession no.
ISKNV	<i>Lates calcarifer</i>	Thailand (Samut Sakhon)	2018	MT128666-MT128667
ISKNV	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Australia	2011	KP292943
ISKNV	<i>Xiphophorus maculatus</i>	Australia	2012	KP292944-KP292947
ISKNV	<i>Trichogaster</i> spp.	Australia (Imported)	2014	KP292948-KP292949
ISKNV	<i>Pterophyllum scalare</i>	Australia (Imported)	2014	KP292950-KP292951
ISKNV	<i>Poecilia latipinna</i>	Australia (Imported)	2014	KP292952
ISKNV	<i>Xiphophorus helleri</i>	Australia (Imported)	2014	KP292953
ISKNV	<i>Colisa labiosus</i>	Australia (Imported)	2014	KP292954
ISKNV	<i>Pterophyllum scalare</i>	Australia (Imported)	2014	KP292955
ISKNV	<i>Siniperca chuatsi</i>	China	1998	AF371960
ISKNV	<i>Astronotus ocellatus</i>	India	2019	MT178414, MT224134
ISKNV	<i>Osphronemus goramy</i>	India	2019	MT178415, MT178417
ISKNV	<i>Astronotus ocellatus</i>	India	2020	MT178416
ISKNV	<i>Epinephelus</i> spp. (hybrid)	Indonesia	2016	MW464172, NW557381
ISKNV	<i>Pterophyllum scalare</i>	Singapore	2016	MK689685
ISKNV	<i>Pagrus major</i>	Taiwan	2007	KT781098
ISKNV	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	USA	2018	MW273353
ISKNV	<i>Epalzeorhynchus frenatus</i>	USA	2019	MW273354
GSIV	<i>Lates calcarifer</i>	Taiwan	2007	KT804738
LYCIV	<i>Pseudosciaena crocea</i>	China	2001	AY779031
OSGIV	<i>Epinephelus coioides</i>	China	2002	AY894343
PIV	<i>Trachinotus carolinus</i>	Dominican Republic	2016	MK098187
RBIV	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	South Korea	2000	AY532606
RSIV	<i>Pagrus major</i>	Japan	1995	AB104413
SFIV	<i>Starry flounder</i>	South Korea	2012	KF499525
TRBIV	<i>Scophthalmus maximus</i>	China	2006	GQ273492

ISKNV = Infectious spleen and kidney necrosis virus, GSIV = Giant seaperch iridovirus, LYCIV = Large yellow croaker iridovirus, OSGIV = Orange-spotted grouper iridovirus, PIV = Pompano iridovirus, RBIV = Rock bream iridovirus, RSIV = Red sea bream iridovirus, SFIV = Starry flounder iridovirus, TRBIV = Turbot reddish body iridovirus

รุ่น 3130 (Applied Biosystems, USA) ตามวิธีการของ บริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำข้อมูลผลการตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งสาย forward และ reverse ที่ได้จาก เครื่องวิเคราะห์มารวมเข้าด้วยกันโดยไม่รวมลำดับ นิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999)

### การตรวจยืนยันชนิดของเชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 530 bp ของ ตัวอย่างที่ศึกษาเพื่อยืนยันชนิดเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (NCBI, 2021) ด้วยโปรแกรม BLASTn จากนั้นดาวน์โหลดลำดับ นิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสใน species ISKNV จากฐาน ข้อมูลของ GenBank (ตารางที่ 2) เพื่อนำมาวิเคราะห์ หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเชื้อที่ศึกษาด้วยการหา เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (percentage of nucleotide sequence identity) โดยใช้โปรแกรม Geneious version 9.1.8 (Biomatters Ltd., New Zealand) และสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum likelihood ร่วมกับโมเดล general time reversible และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA X version 10.2.5 (Kumar *et al.*, 2018)

## ผลและวิจารณ์

### การศึกษาทางพยาธิวิทยา

#### การศึกษาทางมพยาธิวิทยา

ลูกปลากะพงขาว 30 ตัวจากฟาร์มเพาะเลี้ยงใน จังหวัดนครปฐม แสดงรอยโรคที่สังเกตได้จากภายนอก ได้แก่ บริเวณหลังตลอดลำตัวปลา มีสีเข้มขึ้น (hyperpigmentation) ท้องบวม (abdominal distension) ตาโปน (exophthalmos) (รูป 1A และ 1B) และเหงือกซีด (รูป 1C) ซึ่งเป็นรอยโรคหลักที่พบเมื่อเกิด ภาวะโลหิตจาง (Roberts, 2012) และรอยโรคที่พบ เหล่านี้สอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลากะพงขาวที่ติด ISKNV จากธรรมชาติในฟาร์มเพาะเลี้ยงในประเทศไทย

(Kerddee *et al.*, 2021) และเวียดนาม (Dong *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังพบ 80% (24/30) ของลูกปลากะพง ขาวมีหย่อมสีน้ำตาลอ่อนถึงเทาบริเวณซีเหงือก (รูป 1C) และ 26.67% (8/30) มีจุดเลือดออก (petechial hemorrhage) ในลูกตา (รูป 1D)

จากการผ่าซากลูกปลากะพงขาวทุกตัวพบการ เปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายในช่องท้อง ได้แก่ ตับซีดถึงมี สีเหลือง (pale to yellowish) ร่วมกับมีจุดเลือดออก (รูป 1E) บริเวณช่องท้องที่ขยายขนาดพบบมีของเหลวสีใส อยู่ภายใน (รูป 1F) ซึ่งรอยโรคข้างต้นนี้สอดคล้องกับ รายงานรอยโรคในลูกปลากะพงขาวที่ติด ISKNV ตาม ธรรมชาติ (Zhu *et al.*, 2020; Kerddee *et al.*, 2021) แต่สิ่งที่พบต่างจากการศึกษาทั้ง 2 นี้ คือ พบมีมามี ขนาดเล็ก (รูป 1F) นอกจากนี้พบว่าในทางเดินอาหาร ลูกปลาทุกตัวไม่พบอาหาร (รูป 1F) ซึ่งสอดคล้องกับการ รายงานพฤติกรรมกินอาหารลดลงถึงไม่กินอาหารในปลา ที่ติด ISKNV หลายชนิด ได้แก่ ปลากะพงขาว (Dong *et al.*, 2017) ปลาสอด และปลาเทวดา (Jung-schroers *et al.*, 2016; Baoprasertkul and Kaenchan, 2019) และยังพบ 80% (24/30) ของลูกปลากะพงขาวมีเลือดคั่ง ที่ pericardial cavity ของหัวใจซึ่งพบได้เมื่อเกิดภาวะ หัวใจล้มเหลว (Roberts, 2012)

### การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

พบการเปลี่ยนแปลงสำคัญที่ ม้าม ไต เหงือก หัวใจ ตับ และตับอ่อน (ตารางที่ 3) โดยรอยโรคจำเพาะที่ พบ คือ IBC ซึ่งมีขนาดประมาณ 5-10  $\mu\text{m}$  รูปร่างกลม ติดสี basophilic บางเซลล์พบติดสี basophilic ทั้งเซลล์ และบางเซลล์มีสิ่งทีคล้ายนิวเคลียสขนาดใหญ่ใกล้บริเวณ กลางเซลล์ ภายในมีโครงสร้างคล้ายนิวคลีโอไลต์ (รูป 2A) ซึ่งลักษณะ IBC ที่พบนี้มีรูปร่างและขนาดสอดคล้องกับ รายงานในลูกปลากะพงขาวที่ติด ISKNV ในประเทศจีน (Zhu *et al.*, 2020) และรายงานในปลาสวยงามที่ติด ISKNV ซึ่งนำเข้าจากประเทศโคลัมเบียมาที่ประเทศ เยอรมัน (Jung-schroers *et al.*, 2016) สำหรับตำแหน่ง การพบ IBC ในทุกตัวอย่างของการศึกษานี้พบมากที่สุดที่ ม้าม ลำดับถัดมาเป็นไต ส่วนตับ หัวใจ และเหงือกพบน้อย และพบในลูกปลาบางตัวเท่านั้น ขณะที่ตับอ่อนไม่พบ IBC

ซึ่งปริมาณการพบ IBC ในอวัยวะเหล่านี้สอดคล้องกับ รายงานของ Zhu *et al.* (2020) ที่พบสัญญาณ fluorescence ของ ISKNV ด้วยวิธี Immunofluorescence assay มากที่สุดในม้าม ลำดับถัดมาเป็นไต และตับ ส่วนเหงือกพบน้อยที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ hematopoietic tissue ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อสำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดเลือดของปลาที่อยู่บริเวณ stroma ของม้าม และ interstitium ของไต (Roberts, 2012) เป็นเนื้อเยื่อที่พบความเสียหายรุนแรงที่สุด โดยรอยโรคสำคัญที่พบคือการตายแบบ cytolytic necrosis ของ hematopoietic cell (รูป 2B) และม้ามเป็นอวัยวะที่พบรอยโรครุนแรงที่สุดโดยพบการตายของเซลล์เป็นบริเวณกว้าง ด้วยรอยโรคที่พบนี้อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การศึกษานี้ไม่พบการขยายขนาดของม้าม ยิ่งไปกว่านั้นในบริเวณเนื้อเยื่อนี้ ยังพบการลดลงของ melanomacrophage centers (รูป 2C) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการรวมกลุ่มของเซลล์ phagocyte ที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของปลา (Roberts, 2012) โดยลูกปลาอายุ 2.5 เดือนพบรอยโรครุนแรงที่สุด จากรอยโรคที่พบข้างต้นนี้บ่งชี้ว่าการติด ISKNV สามารถนำไปสู่ภาวะโลหิตจางแบบ hypoplastic anemia และภาวะกดภูมิคุ้มกันได้

นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบรอยโรคที่อวัยวะในระบบอื่น ๆ ได้แก่ ไตส่วนท้าย (รูป 2D) ซึ่งเป็นอวัยวะหลักของระบบขับถ่าย พบการเสื่อมของไต โดยเฉพาะบริเวณเซลล์บุท่อไต (renal tubular epithelial cell) มีลักษณะเป็นปื้นติดสี eosinophilic ที่เรียกว่า hyaline degeneration ซึ่งบ่งถึงการล้มเหลวในการทำงานของโซเดียมปั๊มเป็นเวลานาน (Roberts, 2012) และพบ amorphous casts ในท่อไตร่วมกับพบเลือดออกภายใน interstitium ของไต ซึ่งรอยโรคทั้งสองนี้เกิดสัมพันธ์กัน ส่วนหัวใจพบการเสื่อมของกล้ามเนื้อหัวใจในทุกตัวอย่าง ในตับและตับอ่อน (รูป 2E) พบไขมันพอกตับ (hepatic steatosis) ทุกตัวอย่างส่งผลให้ตับทำหน้าที่ลดลง นำไปสู่การบวมน้ำได้ (Roberts, 2012) และบริเวณตับอ่อนพบการตายของ acinar cell (รูป 2E) ซึ่งเป็นรอยโรคที่พบได้กรณีมีการติดเชื้อไวรัส (Roberts and Rodger, 2001) และเหงือกที่เป็นอวัยวะหลักของระบบทางเดิน

หายใจ รอยโรคที่พบส่วนใหญ่อยู่ที่ซี่เหงือก (primary gill lamella) และกิ่งเหงือก (secondary gill lamella) เช่น การแทรกเข้ามาของเซลล์อักเสบ การเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุกิ่งเหงือก (lamellar hyperplasia) และการตายของเนื้อเยื่อบริเวณซี่เหงือก (รูป 2F) เป็นต้น โดยรอยโรคเหล่านี้ทำให้การแลกเปลี่ยนก๊าซของลูกปลาลดลง นำไปสู่การล้มเหลวของระบบทางเดินหายใจได้ อย่างไรก็ตามรอยโรคที่เหงือกเหล่านี้ไม่ใช่รอยโรคหลักของการติด ISKNV อีกทั้งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย โปรโตซัว และสารพิษ (Roberts, 2012) ซึ่งในการศึกษานี้ที่นอกจากการพบ IBC ที่เป็นรอยโรคหลัก บริเวณนี้ยังพบเชื้อชนิดอื่นๆ ด้วย ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียรูปแท่ง ซึ่งอาจเป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรค bacterial gill disease ที่พบได้ทั่วไปบริเวณกิ่งเหงือกในการเลี้ยงลูกปลาแบบหนาแน่น (intensive) (Roberts and Rodger, 2001) และพบเชื้อโปรโตซัว ได้แก่ เห็บประฆัง (*Trichodina* spp.) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yemmen *et al.* (2011) ที่ว่าเห็บประฆังทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน และการตายของเซลล์เยื่อบุกิ่งเหงือกได้

#### การศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ผลการศึกษาด้วย TEM พบ inclusion bodies ที่มี virus assembly site (VAS) ใน hematopoietic cell ของม้ามและไต โดยพบลักษณะเป็น dark matrix และพบอนุภาคของไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ มีลักษณะใกล้เคียงกับรูปร่างแบบ icosahedral (รูป 3A และ 3D) รวมถึงพบลักษณะคล้ายนิวเคลียสที่ภายในมีนิวคลีโอลัสแต่ไม่มีเยื่อหุ้ม อยู่ในไซโตพลาสซึม ซึ่งเป็นลักษณะเดียวกับที่พบในการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในครั้งนี้ โดยสิ่งที่คล้ายนิวคลีโอลัสนี้คือ rough granule ซึ่งบรรจุสารพันธุกรรมของไวรัสปนกับ granule ของนิวเคลียส (Mahardika, 2009) ส่วนนิวเคลียสของ host cell นั้นถูกเบียดไปอยู่บริเวณขอบเซลล์ (รูป 3A) โดยลักษณะ IBC ที่พบดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการพบ IBC ระยะ early stage ในการศึกษาปลากระพงแดงที่ติด RSIV ในประเทศญี่ปุ่นของ Mahardika (2009) และยังตรวจพบอนุภาคไวรัสที่มีลักษณะสมบูรณ์เป็นรูป icosahedral ขนาดประมาณ 165-210 nm ที่มี electron-dense core อยู่ภายใน capsid และล้อมรอบด้วย envelope กระจายอยู่ใน cytoplasm (รูป 3B) ซึ่ง

มีรูปร่างและขนาดสอดคล้องกับไวรัส ISKNV (Chinchar *et al.*, 2017) นอกจากนี้พบเซลล์จากตัวอย่างม้ามและไต มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียส เช่น nuclear collapse และ nuclear invagination (รูป 3C) เป็นต้น ซึ่งบ่งถึงการเสื่อมของเซลล์ (Cheville and Lehmkuhl, 2009)

### การศึกษาทางอณูชีววิทยา

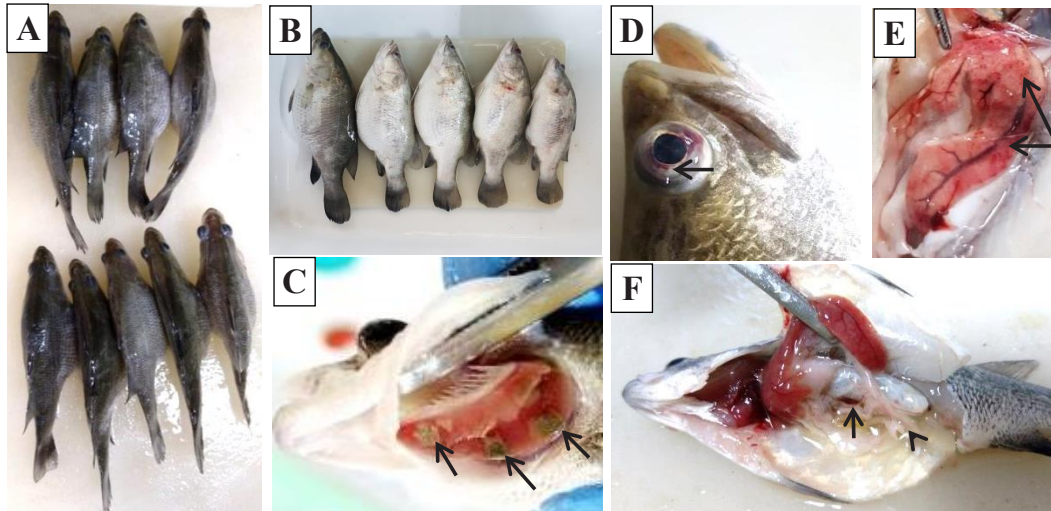
ผลการตรวจตัวอย่าง DNA ทั้ง 4 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR พบให้ผลบวกต่อไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อก่อ RSIVD โดย PCR product มีขนาดประมาณ 570 bp เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kurita *et al.* (1998) เมื่อนำ PCR product มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า PCR product ขนาด 570 bp จากตัวอย่าง DNA ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างขนาด 530 bp (ไม่รวมไพรเมอร์) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank เพื่อยืนยันชนิดเชื้อ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ศึกษามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV มากที่สุด โดยมีค่าสูงถึง 99.81% เมื่อคำนวณโพลีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV และเชื้อ strain อื่นๆ ใน species ISKNV จากฐานข้อมูลของ GenBank มาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV ที่พบในการศึกษานี้ (ตารางที่ 4) พบว่าโดยรวมเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างเชื้อภายใน strain ISKNV อยู่ในช่วง 99.62-100.00% ส่วนเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างเชื้อ strain ISKNV กับเชื้อ strain อื่น ๆ อยู่ในช่วง 92.45-93.58%

สำหรับเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV ที่พบในการศึกษานี้

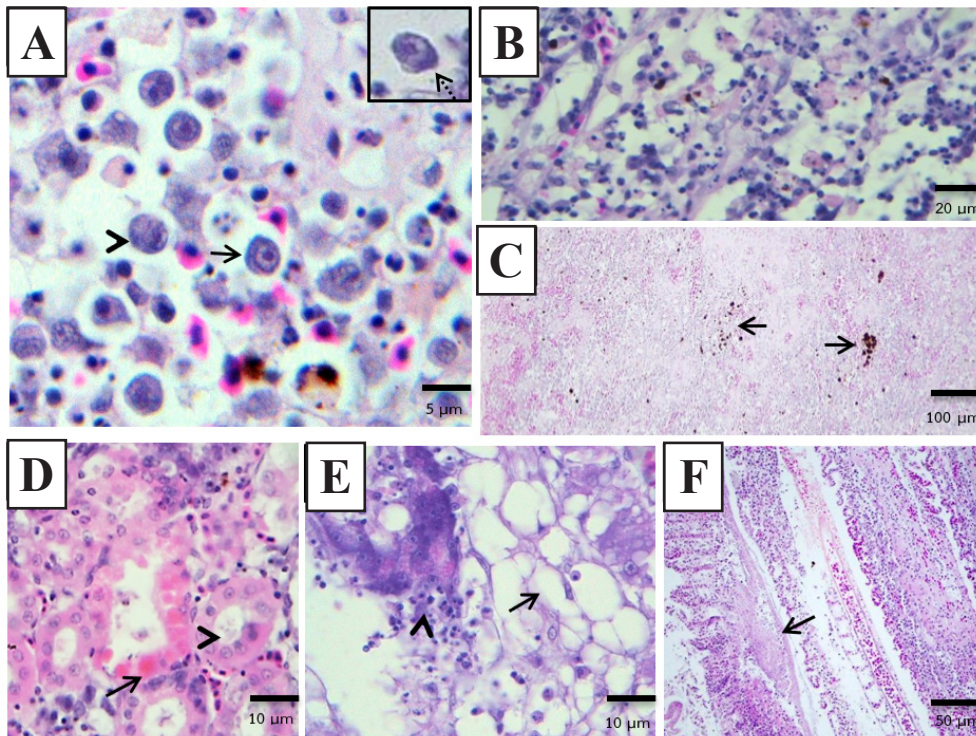
กับเชื้อ strain ISKNV ที่มีรายงานพบในประเทศต่าง ๆ พบว่ามีค่าสูง โดยอยู่ในช่วง 99.62-99.81% เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่พบในประเทศไทย (MT128666-MT128667) จีน (AF371960) ไต้หวัน (KT718098) สิงคโปร์ (MK689685) สหรัฐอเมริกา (MW273353-MW273354) อินเดีย (MT178414-MT178417, MT224134) อินโดนีเซีย (MW464172-MW557381) และออสเตรเลีย (KP292943-KP292947) รวมถึงเชื้อที่พบในปลาที่นำเข้าประเทศออสเตรเลีย (KP292948-KP292955) และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างลำดับ นิวคลีโอไทด์ อยู่ในช่วง 92.45-93.40% เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ strain อื่น ๆ ได้แก่ SFIV และ TRBIV (92.45%), GSIV, OSGIV และ RBIV (93.02%) และ LYCIV, PIV และ RSIV (93.40%)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยืนยันว่า ISKNV ที่พบในจังหวัดนครปฐม จากการศึกษานี้ครั้งนี้ มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงถึง 99.81% (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ ISKNV ที่รายงานพบในจังหวัดสมุทรสาครโดย Kerddee *et al.* (2021) ซึ่งทำการศึกษาเชื้อ strain ISKNV ที่ระบาดในปลากะพงขาวเลี้ยงในฟาร์มเพาะเลี้ยงหลายแห่งในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรปราการ และฉะเชิงเทรา ซึ่งเกิดการระบาดในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับการศึกษานี้ อีกทั้งเป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ใกล้กัน จึงมีโอกาที่การพบเชื้อจากการศึกษานี้เป็นการระบาดของเชื้อ strain เดียวกัน ทั้งนี้ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV จากจังหวัดนครปฐมดังกล่าว ได้นำไปรายงานลงในฐานข้อมูลของ GenBank และได้รับ accession number LC644726-LC644729 สำหรับตัวอย่างจากฟาร์ม A และฟาร์ม B (บ่อ 1-3) ตามลำดับ



รูปที่ 1 แสดงรอยโรคทางมหพยาธิวิทยาที่พบในลูกปลากะพงขาว

- (A) แสดงลำตัวลูกปลาด้านบนที่มีสีเข้ม ท้องบวม และตาโปน
- (B) แสดงลำตัวลูกปลาด้านข้างที่มีลักษณะท้องบวม
- (C) แสดงเหงือกของลูกปลาที่มีลักษณะซีดร่วมกับพบหย่อมเนื้อตาย (<-)
- (D) แสดงตาของลูกปลาที่โปน และมีเลือดออกในลูกตา (<-)
- (E) แสดงตับของลูกปลาที่ซีดร่วมกับพบจุดเลือดออก (<-)
- (F) แสดงในช่องท้องของลูกปลาที่มีของเหลวภายใน ม้ามที่มีขนาดเล็ก (<-) และไม่มีอาหารในทางเดินอาหาร (<-)



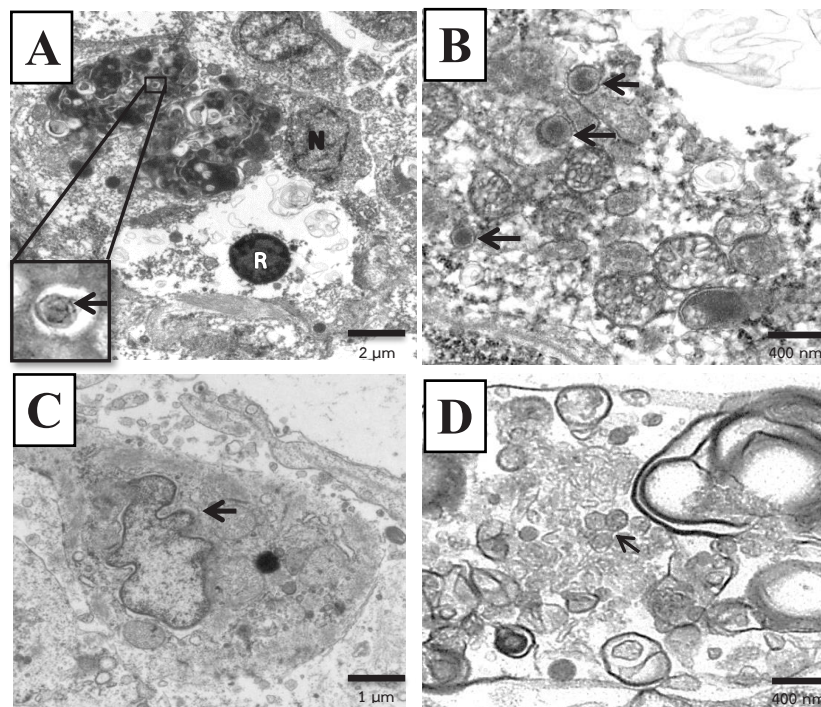
รูปที่ 2 แสดงรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อของลูกปลากะพงขาว

- (A) แสดง IBC ที่ติดสี basophilic ทั้งเซลล์ (>) และที่มีโครงสร้างคล้ายนิวเคลียสอยู่ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ (->) ในเนื้อเยื่อม้าม โดยได้ขยายภาพส่วนของนิวเคลียสที่ถูกเบียดที่มุมบนขวาของรูป
- (B) แสดงการตายแบบ cytolitic necrosis ของ hematopoietic cell ใน interstitium ของไต
- (C) แสดงบริเวณที่เกิดเนื้อตาย และการลดลงของ melanomacrophage centers (->) ในม้าม
- (D) แสดง hyaline degeneration (->) และ amorphous casts (>) ที่พบบริเวณท่อไต
- (E) แสดงรอยโรคไขมันพอกตับ (->) ในตับ และการตายของ acinar cell ในตับอ่อน (>)
- (F) แสดงภาพซีเหงือกที่มีการแทรกของเซลล์อักเสบ การเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุกิ่งเหงือก และการตายของเนื้อเยื่อ (->)

ตารางที่ 3 ระดับความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะของลูกปลากระพงขาวที่ติดเชื้อ ISKNV

Tissues	Histopathological lesions	Severity score of each sample no.			
		1	2	3	4
Spleen	- IBC	+	++	+++	++
	- Hematopoietic tissue necrosis	++	+++	+++	+++
	- Decrease of melanomacrophage centers	++	++	+++	++
Kidney	- IBC	+	++	++	++
	- Hematopoietic tissue necrosis	+	++	+++	++
	- Renal tubular epithelial cell degeneration	+	+++	++	++
	- Decrease of melanomacrophage centers	+	++	+++	++
	- Renal interstitial haemorrhage	++	++	+	++
Gill	- IBC	-	+	+	-
	- Lamellar epithelial cell hyperplasia	+++	+++	+++	+++
	- Lamellar epithelial cell necrosis	+	++	+++	++
	- Inflammatory cell infiltration	+	++	++	+
	- Secondary infection				
	- Rod shaped bacteria	-	+	+	-
- <i>Trichodina</i> spp.	-	+	+++	-	
Heart	- IBC	-	-	+	-
	- Myocardial degeneration	++	++	++	+
Liver	- IBC	-	+	-	-
	- Hepatic steatosis	+++	+++	+++	+++
	- Hepatocellular necrosis	++	+	+	++
Pancreas	- Pancreatic acinar cell necrosis	+++	++	++	++

\* - = no lesion; + = mild lesion; ++ = moderate lesion; +++ = severe lesion



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ hematopoietic cell ในไตและม้ามของลูกปลากระพงขาว

- (A) แสดง IBC ที่พบจากเนื้อเยื่อไต ซึ่งภายในพบ intracytoplasmic inclusion bodies ที่มีการพัฒนา virus assembly site เป็นลักษณะ dark matrix ที่มีอนุภาคของไวรัสที่ไม่สมบูรณ์อยู่ภายใน (-) และ rough granule ที่มีลักษณะคล้ายนิวคลีโอลัสแต่ไม่พบเยื่อหุ้ม (R) ส่วนนิวเคลียสของ host cell พบถูกเบียดอยู่บริเวณขอบเซลล์ (N)
- (B) แสดงอนุภาคของไวรัสที่สมบูรณ์ (complete virion) กระจายอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์จากเนื้อเยื่อไต (-)
- (C) แสดง nuclear invagination ของเซลล์ในเนื้อเยื่อม้ามที่มีการเชื่อม (-)
- (D) แสดงอนุภาคของไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ (incomplete virion) ใน virus assembly site ของเซลล์จากเนื้อเยื่อม้าม (-)

ตารางที่ 4 แสดงผลกา วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 530 bp ของเชื้อ strain ISKNV ที่พบในการศึกษาเกี่ยวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ strain ISKNV (แสดงค่าบนพื้นสีเขียวหรือด้านซ้ายของเส้นทึบ) และเชื้อ strain อื่น ๆ (แสดงค่าบนพื้นสีฟ้าหรือด้านขวาของเส้นทึบ) ใน species ISKNV ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank

Virus strain	Percentage of nucleotide sequence identity																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
1 ISKNV - Thailand/Nakhon Pathom/2018 (LC644726 - 644728)	100	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81
2 ISKNV - Thailand/Nakhon Pathom/2019 (LC644729)		99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81
3 ISKNV - Thailand/Samut Sakhon/2018 (MT128666 - MT128667)			100	100	99.81	100	100	100	100	99.81	99.81	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4 ISKNV - Australia/2011 (KP292943)				100	99.81	100	100	100	100	99.81	99.81	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5 ISKNV - Australia/2012 (KP292944 - KP292948)					99.81	100	100	100	100	99.81	99.81	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6 ISKNV - Australia(imported)/2014 (KP292949)						99.81	100	100	100	99.81	99.81	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7 ISKNV - Australia(imported)/2014 (KP292949)							100	100	100	99.81	99.81	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8 ISKNV - Australia(imported)/2014 (KP292950 - KP292951)								100	100	99.81	99.81	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9 ISKNV - Australia(imported)/2014 (KP292952)									100	99.81	99.81	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10 ISKNV - Australia(imported)/2014 (KP292953)										99.81	99.81	99.81	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11 ISKNV - Australia(imported)/2014 (KP292954)											99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81
12 ISKNV - Australia(imported)/2014 (KP292955)												100	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81
13 ISKNV - China/1998 (AF371960)													99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81	99.81
14 ISKNV - India/2019 (MT178414, MT224134)														100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15 ISKNV - India/2019 (MT178415, MT178417)															100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
16 ISKNV - India/2020 (MT178416)																100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
17 ISKNV - Indonesia/2016 (MW464172, MW557381)																	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
18 ISKNV - Singapore/2016 (MK689685)																		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
19 ISKNV - Taiwan/2007 (KT781098)																			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
20 ISKNV - USA/2018 (MW273353)																				100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
21 ISKNV - USA/2019 (MW273354)																					100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
22 GSIV - Taiwan/2007 (KT804738)																						100	100	100	100	100	100	100	100	100
23 LYCIV - China/2001 (AY779031)																							100	100	100	100	100	100	100	100
24 OS GIV - China/2002 (AY894343)																								100	100	100	100	100	100	100
25 PV - Dominican_Republic/2016 (MK098187)																									100	100	100	100	100	100
26 RBIV - South_Korea/2000 (AY532606)																										100	100	100	100	100
27 RSIV - Japan/1995 (AB104413)																											100	100	100	100
28 SFIV - South_Korea/2012 (KF499525)																												100	100	100
29 TRBIV - China/2006 (GQ273492)																													100	100



ในอนาคต รวมถึงใช้ในการคัดเลือก strain ของเชื้อสำหรับการผลิตวัคซีนที่เหมาะสมกับ strain ที่ระบาดในประเทศ อันจะนำไปสู่การควบคุม และป้องกันโรค เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวในประเทศไทยต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผชช.สนทนา มิเมพันธ์ ที่ให้คำแนะนำตลอดการศึกษา น.สพ.การุณ ชนะชัย และ สพ.ญ.พัชรี เจนช่างกล ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง สพ.ญ.จันทรา วัฒนะเมธานนท์ ที่ให้คำปรึกษาทางปรสิตวิทยา และเจ้าหน้าที่กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

## เอกสารอ้างอิง

- นเรศ กิจจาพัฒน์พันธ์. 2562. “สถานการณ์การผลิตและการค้าปลากะพงขาวและผลิตภัณฑ์ ปี 2562.” [Online]. Available : <https://www.fisheries.go.th/strategy/fisheconomic/Monthly%20report/kapong/กะพงขาวQ4%202019.pdf>. [18 พฤษภาคม 2563]
- เวคิน นพินิตย์. 2524. จุลทัศน์อิเล็กทรอนิกส์. อักษรเจริญทัศน์. กรุงเทพฯ. หน้า 74-80.
- Baoprasertkul, P. and Kaenchan, N. 2019. Distribution and detection of *Megalocytivirus* in ornamental fishes in Thailand. *J. F. E.* 43 (1): 11-24.
- Cheville, N.F. and Lehmkühl, H. 2009. Cytopathology of viral diseases. *In: Ultrastructural Pathology: The Comparative Cellular Basis of Disease.* 2<sup>nd</sup> ed., edited by N.F. Cheville. Wiley-Blackwell, Iowa, U.S.A. p. 318-424.
- Chinchar, V.G., Hick, P., Ince, I.A., Jancovich, J.K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T.B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q., and ICTV Report Consortium. 2017. “ICTV Virus Taxonomy Profile: Iridoviridae.” [Online]. Available: <http://taxonomy.cvr.gla.ac.uk/PDF/Iridoviridae.pdf>. Accessed May 8, 2020.
- Dong, H.T., Jitrakorn, S., Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Rodkhum, C., Rattanarajpong, T., Senapin, S. and Saksmerprom, V. 2017. Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKND) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam. *Fish Shellfish Immunol.* 68: 65-73.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Jung-schroers, V., Adamek, M., Wohlsein, P., Wolter J., Wedekind, H. and Steinhagen, D. 2016. First outbreak of an infection with infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in ornamental fish in Germany. *Dis. Aquat. Organ.* 119 (3): 239-244.
- Kawato, Y., Subramaniam, K., Nakajima, K., Waltzek, T. and Whittington, R. 2017. Iridoviral diseases: red sea bream iridovirus and white sturgeon iridovirus. *In: Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection.* Edited by P.T.K. Woo and R.C. Cipriano. CPI Group, Croydon, UK. p. 147-159.
- Kerddee, P., Dinh-Hung, N., Dong, H.T., Hirono, I., Soontara, C., Areechon, N., Srisapoom, P. and Kayansamruaj, P. 2021. “Molecular evidence for the homologous strains of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) genotype I infecting the inland freshwater cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) in Thailand.” *Arc. Virol.* [in press]. [Online]. Available: <http://doi.org/10.21203/rs.3.rs-399227/v1>. Accessed May 8, 2021.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35 (6): 1547-1549.
- Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I. and Aoki, T. 1998. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.* 33 (1): 17-23.
- Luna, L.G. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3<sup>rd</sup> eds. McGraw-Hill, New York, U.S.A. p. 3-6.
- Mahardika, K. 2009. Electron microscopic study on enlarged cell of red sea bream *Pagrus major* infected by the red seabream iridovirus (RSIV, GENUS *Megalocytivirus*, FAMILY *Iridoviridae*). *I. A. J.* 4 (1): 53-63.
- Mohr, P.G., Moody, N.J.G., Williams, L.M., Hoad, J., Cummins, D.M., Davies, K.R. and Crane, M.S. 2015. Molecular confirmation of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in farmed and imported ornamental fish in Australia. *Dis. Aquat. Organ.* 116 (2): 103-110.
- Roberts, R.J. 2012. Fish Pathology. 4<sup>th</sup> ed. Wiley Blackwell, Oxford, UK. 597 p.
- Roberts, R.J. and Rodger, H.D. 2001. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. *In: Fish pathology.* 3<sup>rd</sup> ed. Edited by R.J. Roberts. Saunders Publishing, London, UK. p. 55-132.

- Suebsing, R., Pradeep, P.J., Jitrakorn, S., Sirithammajak, S., Kampeera, J., Turner, W.A., Saksmerprome, V., Withyachumnankul, B. and Kiatpathomchai, W. 2016. Detection of natural infection of infectious spleen and kidney necrosis virus in farmed tilapia by hydroxynaphthol blue-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Appl. Microbiol.* 121: 55-67.
- Thanasaksiri, K., Takano, R., Fukuda, K., Chaweepeak, T. and Wongtavatchai, J. 2019. Identification of infectious spleen and kidney necrosis virus from farmed barramundi *Lates calcarifer* in Thailand and study of its pathogenicity. *Aquaculture.* 500: 188-191.
- World Organisation for Animal Health (OIE). 2019. "CHAPTER 2.3.8. Red sea bream iridoviral disease." [Online]. Available: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/chapitre\\_rsbid.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_rsbid.pdf). Accessed September 24, 2020.
- Yemmen, C., Ktari, M.H. and Bahri, S. 2011. Seasonality and histopathology of *Trichodina puytoraci* Lom, 1962, a parasite of flathead mullet (*Mugil cephalus*) from Tunisia. *Acta Adriat.* 52 (1): 15–20.
- Zhu, Z., Duan, C., Li, Y., Huang, C., Weng, S., He, J. and Dong, C. 2020. Pathogenicity and histopathology of infectious spleen and kidney necrosis virus genotype II (ISKNV-II) recovering from mass mortality of farmed Asian seabass, *Lates calcarifer*, in Southern China. *Aquaculture.* 534 (8): 736326.