

**INFECTION BY INFECTIOUS HYPODERMAL AND  
HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS IN THE BLACK TIGER  
SHRIMP *PENAEUS MONODON***

**KANOKPORN CHAYABURAKUL**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ANATOMY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2004**

**ISBN 974-04-4796-1**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การติดเชื้อไวรัส INFECTIOUS HYPODERMAL AND HEMATOPIETIC NECROSIS ในกุ้งกุลาดำ  
(INFECTION BY INFECTIOUS HYPODERMAL AND HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS IN  
BLACK TIGER SHRIMP *PENAEUS MONODON*)

กนกพร ฉายะบุระกุล

4337651 SCAN/D

ปร.ด (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: บุญเสริม วิทยานานกุล, MD., PhD., ทิมโมเท วิลเลียม เฟลเกล,  
Ph.D., โคนัด วินสัน ไส้เนอ, Ph.D., ประเสริฐ โสภน, Ph.D., วิชัย บุญแสง Ph.D.,

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของการติดเชื้อไวรัส Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHN) ในกุ้งกุลาดำ แบ่งงานวิจัยออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกเป็นการเปรียบเทียบการติดเชื้อไวรัส IHHNV ในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) โดยใช้เทคนิค histology, *in situ* hybridization, transmission electron microscope (TEM), polymerase chain reaction (PCR) และ real-time PCR พบว่ากุ้งกุลาดำไม่แสดงอาการใดๆจากการติดเชื้อไวรัสนี้ ซึ่งตรงกันข้ามกับกุ้งขาวที่แสดงอาการฟิการตามส่วนต่าง และมีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ในกุ้งกุลาดำ ไม่พบ Cowdry A-type inclusion body เหมือนในกุ้งขาว แต่กุ้งทั้งสองชนิดให้ผลที่เป็นบวกโดยวิธี *in situ* hybridization ในเนื้อเยื่อดังต่อไปนี้ เม็ดเลือดที่หัวใจ เม็ดเลือดที่กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อ hematopoietic เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อได้เปลือก เหงือก ต่อม antennal อย่างไรก็ตามพบว่ามีเนื้อเยื่อประสาท และไขในรังไข่ให้ผลเป็นบวกเฉพาะในกุ้งขาวเท่านั้น ในบรรดาเนื้อเยื่อทั้งหมด พบว่า เม็ดเลือดที่ หัวใจติดเชื้อมากที่สุด ในกุ้งทั้งสองชนิด ส่วนผลทาง TEM พบลักษณะของกระบวนการ necrosis ในกุ้งขาว แต่กลับพบกระบวนการ apoptosis ในกุ้งกุลาดำ ส่วนผลจากการศึกษาปริมาณของไวรัส IHHNV ในแต่ละเนื้อเยื่อในกุ้งที่ติดเชื้อ โดยวิธี real-time PCR พบว่าไม่มีความแตกต่างของไวรัสในแต่ละเนื้อเยื่อของกุ้งที่ติดเชื้อ

ส่วนที่สองเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของรหัส DNA ของไวรัส IHHNV ของทั้งกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำจากแหล่งในประเทศไทย พบความแตกต่างประมาณ 5% ในส่วนของ structural protein และส่วนใหญ่ไวรัสที่ศึกษาลายกับกลุ่มไวรัส IHHNV ของฮาวาย แต่มีอยู่แหล่งหนึ่งที่เหมือนกับไวรัสของกุ้งกุลาดำที่นำเข้ามาจากไทยเข้าสหรัฐ และยังพบว่ารหัส DNA ของไวรัสของกุ้งทั้งสองชนิดในประเทศไทยมีความแตกต่างกันอย่างมาก

ส่วนสุดท้ายเป็นการศึกษาผลการเจริญเติบโต และความคกของจำนวนไข่จากการวางไข่แต่ละครั้งของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของแม่พันธุ์ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ ถึงแม้ว่าผลทางด้าน histology และ *in situ* hybridization จะไม่แตกต่างกับกลุ่มแรก

**INFECTION BY INFECTIOUS HYPERDERMAL AND HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS IN BLACK TIGER SHRIMP *PENAEUS MONODON***

KANOKPORN CHAYABURAKUL 4337651 SCAN/D

Ph.D. (ANATOMY)

THESIS ADVISORS : BOONSIRM WITHYACHAMNARNKUL, Ph.D., TIMOTHY W FLEGEL, Ph.D., DONALD V LIGHTNER, Ph.D., PRASERT SOBHON, Ph.D., VICHAI BOONSENG, Ph.D.

**ABSTRACT**

The purpose of this research is to study the effects of an infection of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* by infectious hypodermal and hematopoietic necrosis viruses (IHHNV). The study is divided into three parts. The first part is to compare histopathology and tissue tropism of IHHNV infection between *P. monodon* and *P. vannamei*, using histology, *in situ* hybridization, transmission electron microscopy (TEM), polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. It was found that *P. monodon* infected by IHHNV showed no clinical manifestation, whereas *P. vannamei* infected by the same virus suffered runt-deformity syndrome and with considerable mortality. Histological examination of IHHNV-infected *P. monodon* revealed no Cowdry A-type inclusion (CAI), which is typical of IHHNV infection in *P. vannamei*. By *in situ* hybridization, tissues that were found positive in both shrimp species were the hemocytes and fixed phagocytes in the heart, skeletal muscle, in hemal sinuses of the hepatopancreatic tubules, hematopoietic tissue, connective tissue, subcuticular epithelium, gills and the antennal tubule. The only tissues that were positive in *P. vannamei* were ovary and neural tissue. Among all the tissues examined by *in situ* hybridization, the heart muscle showed the strongest positive reaction in both shrimp species. Under TEM, necrotic process was observed in tissues of IHHNV-infected *P. vannamei*, whereas apoptotic process was observed in *P. monodon*.

The amount of viral particles as determined by real-time PCR revealed the levels of the virus particles in several tissues studied in *P. monodon*. The levels of viral loads in various tissues, however, did not significantly differ.

In the second part, DNA of IHHNV from six isolates, from both *P. monodon* and *P. vannamei*, were sequenced. Differences among the sequences suggests that IHHNV isolates in Thailand can be grouped into one that is similar to an original IHHNV isolate in Hawaii (from *P. vannamei* in 1980's) and the other to an isolate from *P. monodon* broodstock that were shipped to University of Arizona in 2002. The difference between the two lines is about 5% and mainly in the ORF 3, which encodes structural proteins. The sequence of IHHNV isolates that infected *P. vannamei* and *P. monodon* in Thailand were closely related.

In the last part of the study, the growth and fecundity of the IHHNV-infected *P. monodon* domesticated broodstock, as well as the histopathology, were determined. The infected shrimp showed the same growth rate as their non-infected cohorts. Histology and *in situ* hybridization revealed similar features as found in the first study. In the ovary, positive reactions were absent in oocytes but confined to the ovarian capsule and follicular cells.

**KEY WORDS : IHHNV / *P. monodon* / *P. vannamei* / SEQUENCE  
REAL-TIME PCR/ APOPTOSIS/ FECUNDITY**

173 pp. ISBN 974-04-4796-1