

**RICKETTSIA-LIKE ORGANISM (RLO) INFECTION IN THE
ABALONE *HALIOTIS DIVERSICOLOR SUPERTEXTA*:
HISTOPATHOLOGY, DIAGNOSIS AND TREATMENT**



THANITSARA WETCHATENG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ANATOMY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

RICKETTSIA-LIKE ORGANISM (RLO) INFECTION IN THE ABALONE
HALIOTIS DIVERSICOLOR SUPERTEXTA; HISTOPATHOLOGY, DIAGNOSIS
AND TREATMENT

THANITSARA WETCHATENG 4636504 SCAN/D

Ph.D. (ANATOMY)

THESIS ADVISORS: BOONSIRM WITHYACHUMNARNKUL, M.D., Ph.D.,
KANOKPAN WONGPRASERT, Ph.D., PRASERT SOPHON, Ph.D., CAROLYN S.
FRIEDMAN, Ph.D.

ABSTRACT

Withering syndrome (WS) in abalone is caused by an infection from Rickettsia-like organisms (RLOs), "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*". Infection by this pathogen in small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* has not been reported to date; this study is the first report of WS in this abalone species. Under light microscopy, the RLOs were observed in the cytoplasm of the epithelium cells lining mainly the post-esophagus of *H. diversicolor*. Under transmission electron microscopy, ultrastructure of the RLOs is similar to the RLOs infecting other abalone species. The presence of RLOs was confirmed by *in situ* hybridization, polymerase chain reaction (PCR), and quantitative real-time PCR, using primers specific for 16S rDNA of RLO infecting red abalone *H. rufescens*. Sequence analysis of the limited PCR product revealed 93% similarity to RLO detected in the red abalone *H. rufescens*. Young *H. diversicolor* (2 mo old) without WS clinical manifestations, were also infected by RLO as detected by quantitative real-time PCR. The abalone were treated by oxytetracycline (OTC) by oral administration at 6g/kg feed for 14 consecutive days. This eliminated WS and mortality in the stock, as well as a significant reduction in RLO load in the post-esophagus of the abalone. At the drug withdrawal day 21, residual OTC was < 2 ppm in the digestive gland and foot muscle as determined by ELISA, this level is considered safe for human consumption. Zero level of OTC was observed at the withdrawal day 90.

KEY WORDS: *Haliotis diversicolor*/ "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*"/ 16S

rDNA/ Withering Syndrome/ Oxytetracycline

59 pp.

การศึกษาด้านพยาธิสภาพ การวินิจฉัย และการใช้ยาปฏิชีวนะ ในโรคติดเชื้อริกเก็ตเซีย ในหอยเป๋าฮื้อ *HALIOTIS DIVERSICOLOR SUPERTEXTA*: (RICKETTSIA-LIKE ORGANISM (RLO) INFECTION IN THE ABALONE *HALIOTIS DIVERSICOLOR SUPERTEXTA*; HISTOPATHOLOGY, DIAGNOSIS AND TREATMENT)

ธนิตรา เวชแดง 4636504 SCAN/D

ปร.ค. (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: บุญเสริม วิทยชานาญกุล, Ph.D., กนกพรรณ วงศ์ประเสริฐ, Ph.D., ประเสริฐ โสภณ, Ph.D., Carolyn S Friedman, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง (Withering Syndrome, WS) ในหอยเป๋าฮื้อมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียประเภทริกเก็ตเซีย ที่เรียกว่า “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” การติดเชื้อชนิดนี้ยังไม่มีรายงานในหอยเป๋าฮื้อในแถบทวีปเอเชีย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวินิจฉัยโรค WS ในหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis diversicolor Supertexta* ที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ในไต้หวัน และในประเทศไทย ที่พบว่ามีอาการ WS เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา พบ inclusions ในไซโตพลาสมของ epithelium ของหลอดอาหารส่วนหลังของหอยเป๋าฮื้อ เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบแบคทีเรียริกเก็ตเซีย เป็นแบบ bacillus ขนาดประมาณ 200 x1800 nm ซึ่งคล้ายกับแบคทีเรียที่พบในหอยเป๋าฮื้อที่ติดเชื้อแบบเดียวกันในแถบทวีปอเมริกา ได้ทำการวินิจฉัยด้วยวิธี *in situ* hybridization และ polymerase chain reaction (PCR) ด้วย ซึ่งพบการติดเชื้อเช่นเดียวกัน และพบว่า DNA sequence จาก PCR product ที่ได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวที่พบในทวีปอเมริกาด้วย นอกจากนี้ ยังได้ใช้วิธี quantitative real-time PCR เพื่อตรวจดูหอยขนาดเล็ก อายุประมาณ 2 เดือน ซึ่งไม่มีอาการ WS ก็พบว่ามีการติดเชื้อเช่นเดียวกัน บ่งบอกว่าการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อาจเกิดขึ้นตั้งแต่หอยยังมีอายุน้อยๆ แต่จะแสดงอาการ WS เมื่อมีอายุมากขึ้น ได้รักษาโรคนี้ด้วยยาปฏิชีวนะ oxytetracycline ผสมในอาหารที่อัตรา 6 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นระยะเวลา 14 วันติดต่อกัน หลังการให้ยาพบว่าอาการ WS ถูกกำจัดหมดไป และไม่พบ inclusion เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่เมื่อตรวจด้วย PCR และ real-time PCR ก็ยังพบว่ายังมีปริมาณของแบคทีเรียหลงเหลืออยู่แต่น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากการให้ยาแล้ว พบว่าปริมาณการตกค้างของยา หลังจากหยุดยาแล้ว 21 วัน อยู่ในระดับ <2 ppm ซึ่งปลอดภัยต่อการบริโภค