

**STUDY OF RICKETTSIA-LIKE BACTERIA (RLB) ASSOCIATED
WITH CULTIVATED SHRIMP IN THAILAND**



NUCHANART TARDMEE

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

STUDY OF RICKETTSIA-LIKE BACTERIA (RLB) ASSOCIATED WITH CULTIVATED SHRIMP IN THAILAND

NUCHANART TARDMEE 4937308 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: TIMOTHY WILLIAM FLEGEL, Ph.D., BOONSIRM WITHYACHUMNARNKUL, Ph.D., NITI CHUCHIRD, Ph.D., WANSIKA KIATPATHOMCHAI, M.Sc.**ABSTRACT**

Since 2005, severe mortalities of *P. vannamei* have occurred in some grow-out ponds in Thailand. Gross signs of hepatopancreatic necrosis were displayed similar to that seen in shrimp exhibiting Texas necrotizing hepatopancreatitis (TNHP), a severe disease caused by a rickettsia-like bacterium (RLB) and originally reported in Texas, USA. However, a PCR assay of the affected Thai shrimp gave negative results using a commercial kit designed for specific detection of TNHP. In addition, the use of published PCR methods with some of these shrimp gave amplicons with sequences that shared only 35% to 75% identity with TNHP bacteria. This indicated that the organism(s) causing hepatopancreatic necrosis in Thailand were distinct from those causing TNHP in the Americas. However, the sequences of amplicons obtained using the nested PCR primers standard for the 16S rRNA gene of RLB (Rick-1) showed 90-98% sequence identity with some sequences of the alpha-proteobacteria (rickettsia) group. Some healthy shrimp showed similar amplicons to those of the diseased shrimp. Thus the Rick-1 primer was inadequate for detection of RLB associated with hepatopancreatic disease in Thailand. Consequently, primer sets were designed from variable regions of the 16S rRNA gene derived from moribund shrimp in Thailand (Rick-2 and Rick-3). These probes did not bind with lesions in the hepatopancreatic tissue of diseased shrimp from the field or from stress tests by *in situ* hybridization assay, but some did bind with epicomensal protozoa. In addition, a stressful environment can lead to an increase in the mortality rate but was not associated with hepatopancreatic necrosis. The nucleotide sequences obtained in this study were analyzed and grouped as derived from 21 putative species of alphaproteobacteria. Thus, Rick-6 primers were developed to study more length of these sequences. So, these shared high sequence identity with *Vibrio* species. The use of monoclonal antibodies (MAbs) for immunohistochemical analysis revealed that hepatopancreatic lesions found in the Thai specimens were most often associated with *Vibrio* species such as *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* and not with RLB.

KEY WORDS: HEPATOPANCREATIC NECROSIS/ RICKETTSIA-LIKE BACTERIA/ RLB/ STRESS TEST/ SHRIMP

111 pages

การศึกษาแบคทีเรียในกลุ่ม RICKETTSIA ที่พบในฟาร์มเลี้ยงกุ้งของประเทศไทย

STUDY OF RICKETTSIA-LIKE BACTERIA (RLB) ASSOCIATED WITH CULTIVATED SHRIMP IN THAILAND

นุชนาฏ ตาดมี 4937308 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, Ph.D., บุญเสริม วิทยชำนาญกุล, Ph.D., นิตี ชูเชิด, Ph.D., วรณสิกา เกียรติปทุมชัย, M.Sc.

บทคัดย่อ

ตั้งแต่ปี 2548 อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งขาวในประเทศไทยได้รับผลกระทบอย่างมากจากปัญหาอัตราการตายของกุ้งที่สูงผิดปกติ ซึ่งกุ้งที่ตายนั้นพบว่ามีลักษณะของตับที่ผิดปกติคล้ายโรคตับอักเสบที่ระบาดในรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา (TNHP) เมื่อปี 2528 แต่เมื่อตรวจด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดตรวจที่จำเพาะกับ TNHP กลับให้ผลลบ ในขณะที่การใช้ชุดตรวจสำหรับ NHP ทั่วไปให้ผลบวกแต่ลำดับเบสกลับเหมือนกับ TNHP เพียง 35 – 75 % แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดภาวะตับอักเสบในกุ้งที่ระบาดในประเทศไทยนั้นเป็นเชื้อคนละสายพันธุ์กับเชื้อ TNHP เมื่อตรวจด้วยไพรเมอร์ Rick-1 ที่ใช้ตรวจเชื้อ RLB ทั่วไป พบว่าให้ผลบวกที่มีลำดับเบสเหมือนกับแบคทีเรียในกลุ่มแอลฟาโปรติโอติง 90 – 98 % อย่างไรก็ตามกุ้งปกติก็ให้ผลบวกเช่นเดียวกัน แสดงว่าไพรเมอร์ Rick-1 นี้ไม่สามารถตรวจแยกกุ้งป่วยและกุ้งปกติออกจากกันได้ ดังนั้นไพรเมอร์ชุดใหม่ คือ Rick-2 และ Rick-3 จึงถูกออกแบบขึ้นจากยีน 16S rRNA ของเชื้อ RLB ที่ได้จากกุ้งที่มีอาการตับอักเสบในประเทศไทย ซึ่งพบว่าไพรเมอร์ทั้งสองมีความจำเพาะกับกุ้งที่มีอาการตับอักเสบมากขึ้น จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดของเชื้อ RLB ในประเทศไทยพบว่า สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งนั้นมีผลทำให้อัตราการตายของกุ้งสูงกว่าปกติ แต่ไม่เกี่ยวข้องกับอาการตับอักเสบในกุ้ง ซึ่งเมื่อทำการยืนยันผลด้วยเทคนิค *in situ* hybridization โดยใช้โพรบที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ Rick-1, Rick-2 และ Rick-3 พบว่าทั้งกุ้งที่ป่วยตามธรรมชาติ และกุ้งที่ได้จากการทำ stress test ให้ผลลบในเนื้อเยื่อตับบริเวณที่มีการอักเสบ แต่ให้ผลบวกกับโปรโตซัวชนิดหนึ่งที่มีเกาะตามเนื้อเยื่อ (epicommensal protozoa) แสดงให้เห็นว่า ผลบวกที่ได้จาก PCR อาจไม่เกี่ยวข้องกับเชื้อก่อโรคตับอักเสบ จากการศึกษาสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอลฟาโปรติโอได้เป็น 21 สปีชีส์ จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ Rick-6 เพื่อศึกษาลำดับเบสที่ยาวขึ้นของเชื้อที่ได้ ซึ่งลำดับเบสที่ได้นี้ มีส่วนที่เหมือนกับเชื้อ *Vibrio* sp. เป็นอย่างมาก จึงยืนยันด้วยการทำ immunohistochemistry โดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Vibrio* sp. พบว่าให้ผลบวกกับตับกุ้งที่มีอาการตับอักเสบด้วย แสดงให้เห็นว่าอาการของโรคตับอักเสบที่พบระบาดในประเทศไทยส่วนใหญ่ มีสาเหตุจากเชื้อ *Vibrio* sp. มากกว่าที่จะเป็นเชื้อ RLB หรือ TNHP