LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

VIRAL CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF SPECIFIC DETECTION FOR YELLOW-HEAD AND WHITE-SPOT DISEASES IN *PENAEUS MONODON*

CHAINARONG WONGTEERASUPAYA

With compliments
of
.....

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)

IN

Copyright by Mahidol University

TH
C434V
1996

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาลักษณะของไวรัสและการพัฒนาการตรวจสอบที่จำเพาะของโรคหัวเหลืองและโรคดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

ผู้วิจัย ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วิชัย บุญแสง Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D.

บุญเสริม วิทยชำนาญกุล Ph.D.

ทิม โมที วิลเลียม เฟลเกล Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 24 กันยายน พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

ในปี พ.ศ. 2534 อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้รับความเสียหายจากการระบาดของเชื้อไวรัสหัวเหลืองและเชื้อไวรัสดวงขาวประมาณความเสียหายมากมายถึง 25% ของผลผลิตในปีพ.ศ.2538 (ช่วงปีแรก)

ในระยะเริ่มแรกเชื้อไวรัสหัวเหลืองถูกรายงานว่าเป็น DNA แต่จากการศึกษาพบว่าไม่สามารถสกัด DNA จากเชื้อนี้ได้ จึงได้ทำการสกัด RNA จากเชื้อนี้โดยใช้ guanidium thiocyanate และเตรียม RNA ให้บริสุทธิ์โดยใช้ CsCl gradient ultracentri-fugation ผลการทดลองพบว่าสามารถ เตรียม RNA ได้ในปริมาณมาก จึงได้จัดไวรัสหัวเหลืองให้อยู่ในกลุ่มไวรัส RNA (Rhabdoviruses หรือ Coronaviruses) จากนั้นได้ทำการเตรียม clone จาก cDNA ของเชื้อไวรัส แลหาลำดบเบส จาก clone ที่มีความจำเพาะต่อ เชื้อไวรัสหัวเหลือง และได้ออกแบบ primer จากลำดับเบสเพื่อใช้ในการตรวจสอบ RNA โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบ RT-PCR ซึ่งผลผลิต RT-PCR มีขนาด135 เบส ตรงกับขนาดที่ออกแบบไว้ การทำ RT-PCR เพื่อตรวจเชื้อไวรัสหัวเหลืองให้ผลที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถทำการตรวจ RNA ได้ถึง 0.01 pg และ

Copyright by Mahidol University

มีความไวสูงกว่าการ ตรวจเนื้อเยื่อโดยย้อมสี hematoxylin และ eosin ผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ อย่างมากในการตรวจสอบไวรัสหัวเหลือง ซึ่งจะส่งผลถึงความสามารถในการป้องกันการระบาดของโรคได้

ในระหว่างการศึกษาไวรัสหัวเหลืองได้ค้นพบไวรัสดวงขาวโดยบังเอิญ ไวรัสดวงขาวมีความรุนแรง และมีผลกระทบอย่างมากต่อการตายของกุ้งกุลาดำ ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนพบว่า ไวรัสมีขนาด 276x121 nm ลักษณะเป็นวงรีถึงรูปไข่ มีสารพันธุ-กรรมเป็น DNA ขนาดประมาณ 168 kb จึงจัดเชื้อไวรัสอยู่ในกลุ่ม Baculoviridae, subfamily Nudibaculovirinae หรือ PmNOB II ส่วนมากจะเรียกไวรัสดวงขาวตามพยาธิสภาพว่า Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) จากการทำ clone ของ SEMBV ที่ *Bam*HI และ *Eco*RI พบว่า clone ขนาด 0.9 kb และ ขนาด 4.2 kb ที่มีความจำเพาะต่อ SEMBV จากนั้นนำ clone 4.2 kb ติดฉลากสารปลอดรังสีและใช้ตรวจ SEMBV โดยวิธี *in situ* hybridization ผลการศึกษาพบว่า clone ทั้งสองนี้ให้ผลบวกกับเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ SEMBV จากกุ้งชนิดต่างๆ เช่น *Penaeus chinensis, P. indicus, P. japonicus, P. merguiensis, P. monodon* และ *P. vannamei* ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า SEMBV มีระบาดอยู่ทั่วภูมิภาคเอเชีย

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Viral Characterization and Development of Specific Detection for Yellow-Head and White-Spot Diseases in *Penaeus monodon*

Name Chainarong Wongteerasupaya

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Vichai Boonsaeng, Ph.D.
Sakol Panyim, Ph.D.
Prapon Wilairat, Ph.D.
Boonsirm Withyachumnarnkul, Ph.D.
T.W. Flegel, Ph.D.

Date of Graduation 24 September B.E. 2539(1996).

ABSTRACT

Yellow-head virus (YHV) first caused extensive losses in cultivation of the black tiger prawn, *Penaeus monodon* , in Thailand in 1991. This was subsequently followed by a widespread epizootic from white spot virus (WSV), also called systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV), beginning in late 1994. The pond side losses caused by these two viral diseases may account in substantial part for the 25 % drop in shrimp production in the first half of 1995 when compared to the first half of 1994.

Copyright© by Mahidol University

of purified virus gave only traces of DNA. Furthermore, negatively stained virions of YHV viewed by transmission electron microscopy (TEM) were atypical for baculoviruses and viral assembly was cytoplasmic. Therefore, renewed attempts to extract nucleic acid from purified YHV preparations focused on RNA rather than DNA. Nucleic acid was extracted using guanidium thiocyanate and purified by CsCl gradient ultracentrifugation. High-molecular-weight nucleic acid was obtained which was degraded by RNaseA but not by DNaseI. Based on morphology of negatively stained virions by TEM and on RNA content, YHV resembled rhabdoviruses or coronaviruses, rather than baculo-viruses. Because YHV was an RNA virus, development of nucleic acid probes required preparation of cDNA from the viral RNA before cloning steps could be performed. Based upon a sequence of the cloned YHV genomic fragment, a YHV specific primer set for RT-PCR was designed to detect YHV infection in penaeid shrimp. Samples which contained YHV yielded an evident amplification product showing the expected size of a 135 bp fragment. By contrast nucleic acids extracted from tissue samples of clinically healthy shrimp and from other shrimp pathogens showed no such fragment. This confirmed the specificity of the designed YHV RNA specific primers. RT-PCR based detection demonstrated high sensitivity in that it could detect 0.01 pg of purified RNA. The results demonstrated a much more sensitive detection of YHV when compared to hematoxylin and eosin staining. The present studies provided an effective diagnostic tool for screening shrimp for YHV infection. This may be extremely important in preventing further spread of this viral disease.

In the course of experimental infection of *Penaeus monodon* with YHV for virus isolation and purification, one batch of prawns yielded a

Copyright by Mahidol University

hemolymph fraction dominated by a previously undescribed non-occluded baculovirus, rather than YHV. Injection of test shrimp with a semipurified preparation of this virus gave rapid mortality, and examination with TEM revealed a dual infection where cells containing the new virus were prominent, but where some cells containing YHV could also be seen. The tissues infected by the two viruses were similar. However, in contrast to YHV, the new virus was assembled completely in the nucleus. By negative staining, completely assembled, enveloped virions were ellipsoid to obovate with a distinctive multifibrillar appendage and they measured 276x121 nm. Isolation and purification of the nucleic acid from the new virus gave double-stranded DNA of approximately 168 kb. This DNA did not cross-hybridize with DNA fragments from monodon baculovirus (MBV). The features placed this virus in the family Baculoviridae, subfamily Nudibaculovirinae as PmNOBII, but for convenience it was informally named white spot virus (WSV), or systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV). It has also been called white-spot baculovirus (WSBV). Contemporary reports showed that WSV infections in several penaeid shrimp species exhibited similar gross signs and histopathology. After DNA extraction, *Bam*HI and *Eco*RI digested fragments of the SEMBV genome were cloned. Inserted DNA fragments of 0.9 kb and 4.2 kb were characterized and used as non radioactive probes for *in situ* DNA hybridization. For viral infected nuclei identified by hematoxylin and eosin staining in parallel samples, the 4.2 kb fragment gave a stronger DNA hybridization signal than did the 0.9 kb fragment. The 4.2 kb fragment was then used for *in situ* DNA hybridization tests with commercially or experimentally cultivated shrimp specimens showing gross signs and histopathology characteristic of white-spot virus

Copyright by Mahidol University

infection. All these specimens gave positive hybridization results. They included cultivated shrimp specimens of *Penaeus chinensis*, *P. indicus*, *P. japonicus*, *P. merguiensis*, *P. monodon*, and *P. vannamei* obtained from various countries in Asia. The data indicate that SEMBV is currenly responsible for a widespread epizootic in the Asian shrimp farming industry.

Copyright by Mahidol University