

การแยกและคุณลักษณะของเชื้อ Nodavirus ในปลาหมอตทะเล (*Epinephelus lanceolatus*)
Isolation and characteristics of nodavirus from giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*)

สมพร รุ่งกำเนิดวงศ์¹ สมเกียรติ์ กาญจนาคาร² และ เยาวินทรีย์ ดนยดล³

¹ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา กรมประมง

² สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรุงเทพฯ กรมประมง

³ สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา กรมประมง

บทคัดย่อ

การแยกและเพาะเชื้อไวรัสในพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอตทะเลที่แสดงอาการท้องบวมในลักษณะมีอากาศ อยู่ภายในช่องท้อง และว่ายน้ำไม่ค่อยดี ด้วยวิธีการกรองส่วนผสมของตาและสมองและเพาะเชื้อไวรัสด้วยเซลล์เนื้อเยื่อ E-11 cell line (striped snakehead cell clone) เริ่มสังเกตเห็นไวรัสทำลายเซลล์ในลักษณะเซลล์หดกลมในวันที่ 3 หลังการเพาะเชื้อและเมื่อทดลองเพาะเชื้อใน E-11 cell line ต่อไปอีก 3 ครั้ง พบมีการทำลายเซลล์เหมือนกับครั้งแรก หลังการทำเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์และนำไปตรวจอนุภาคไวรัส ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสรูปร่างแบบ icosahedral เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25-30 นาโนเมตร ผลการศึกษาคุณสมบัติของไวรัสพบว่าไม่ถูกยับยั้งด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม และสารละลาย IUDR ซึ่งแสดงว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelope) และมีกรดนิวคลีอิกเป็นชนิด อาร์เอ็นเอ (RNA virus) จากการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสที่แยกได้และเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นดีเอ็นเอและสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในปฏิกิริยาห่วงโซ่เพอริเมอร์เลส (RT-PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อเชื้อโนตะไวรัสที่ 1,410 เบส พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอที่ประมาณ 1,410 เบส และเมื่อนำลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ เปรียบเทียบ (blast) กับลำดับเบสของสายดีเอ็นเอที่มีรายงานใน GenBank พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้มีลำดับเบสที่เหมือนกับเชื้อโนตะไวรัส สายพันธุ์ RGNNV SJNNV BFNNV และ TPNNV เท่ากับ 98 98 79 83 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอตทะเลเป็นเชื้อไวรัสในครอบครัว nodaviridae และจัดอยู่ในกลุ่ม (genotype) RGNNV

คำสำคัญ : ปลาหมอตทะเล การแยกเชื้อ คุณสมบัติเชื้อ โนตะไวรัส ปฏิกิริยาห่วงโซ่เพอริเมอร์เลส ลำดับเบส

ABSTRACT

Isolation of pathogenic agent causing disease in giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) brood stock in southern Thailand was succeeded in March 2001. After three days of inoculation the filtration of pool eyes and brain of diseased samples, cytopathic effect (CPE) which recognized by rounded shape of the E-11 cell line (clone of SSN-1 cells) were observed. The character of CPE, as seen in the first passage, was also found in E-11 throughout the three passage of the virus inoculation. Characterization of the isolated virus were confirmed using electron microscope. There were several virions in icosahedral shape, with 25-30 nanometer of diameter. The isolated virus was not sensitive to chloroform and IUDR which indicated that they were non-enveloped RNA virus. This isolated virus designed as GGNV. The GGNV was also identified by reverse transcriptase polymerase chain

reaction (RT-PCR) and sequence analysis of PCR product clone was conducted RT-PCR amplification using primers designed from betanodavirus genotype (GenBank acc.# AY721615) gave a single PCR product estimated at 1,410 bp. The products were clone and sequenced. Nucleotide sequence comparison of RT-PCR products were closely related with 98% homology to those of genotype RGNNV, 79% to genotype SJNNV, 83% to genotype BFNNV and 78% to genotype TPNNV. Finding indicated the new isolated virus from giant grouper brood stock can be classified as members of Nodaviridae and genotype RGNNV.

Keywords : Giant grouper Isolation Characteristics Nodavirus RT-PCR Sequencing

คำนำ

เชื้อไวรัสในครอบครัว Nodaviridae แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ Alphanodavirus ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในแมลง (Schneeman *et al.* 1998) และ betanodavirus เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในปลา โดยเฉพาะในปลาทะเล เชื้อนี้จะก่อโรค viral nervous necrosis (VNN, Yoshikoshi and Inoue., 1990) หรือ viral encephalopathy and retinopathy (VER, Mori *et al.*, 1992) เป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับปลาทะเลที่เพาะเลี้ยงหลายชนิดทั่วโลก พบมากในกลุ่มปลากะรัง (grouper), ปลากะพงขาว (sea bass) และปลาอื่นๆ เช่น parrotfish, striped jack และ halibut เป็นต้น (Mori *et al.*, 1992 ; Chi *et al.*, 1997 ; Breuil *et al.*, 1991 ; Munday *et al.*, 1992 ; Yoshikoshi and Inoue, 1990 และ Grotmol *et al.*, 1995) ส่วนใหญ่มีกั๊กโค็ดในลูกปลาวัยอ่อนและมีอัตราการตายสูงมาก โดยเชื้อไวรัสจะเข้าทำลายระบบประสาทตาและสมอง (Mori *et al.*, 1992 ; Comps *et al.*, 1994) คุณลักษณะของเชื้อไวรัสโดยทั่วไป เป็นเชื้อไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelope) มีรูปร่างแบบ icosahedral ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25-30 นาโนเมตร ยีนมประกอบด้วยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 2 สาย สายแรกไม่สร้างโปรตีน มีขนาดประมาณ 3.1 กิโลเบส สายที่ 2 ให้โปรตีน มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส (Van Regenmortel *et al.* 2000) หลังจากพบสาเหตุของโรคนี้นักวิจัยหลายท่านพยายามแยกและเพาะเชื้อ nodavirus ด้วย cell line ชนิดต่างๆ แต่ไม่ประสบความสำเร็จ (Breuil *et al.*, 1991 ; Mori *et al.*, 1991 ; Munday *et al.*, 1992 ; Nguyen *et al.*, 1994 และ Grotmol *et al.*, 1995) จนกระทั่งในปี 1996 Frerichs และคณะประสบความสำเร็จในการเพาะเชื้อ nodavirus จากปลา sea bass (*Dicentrarchus labrax*) โดยใช้ SSN-1 cell line ซึ่งเป็นเซลล์ที่ผลิตได้จากปลาช่อน (*Ophicephalus striatus*) (Frerich *et al.*, 1991) จากความสำเร็จในครั้งนั้นเป็นจุดเริ่มต้นให้นักวิจัยจากหลายประเทศนำเอา SSN-1 cell ไปใช้ในการศึกษาเชื้อ nodavirus กันแพร่หลายเช่น ในปี 2000 Dannevig และคณะ ใช้ SSN-1 cell line แยกเชื้อ nodaviridae ที่ทำให้เกิดโรคในปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) ในประเทศนอร์เวย์และในปี 1999 Wanatabe และ Yoshimizu ได้ศึกษารายละเอียดของเชื้อ nodavirus ของ cell line 32 ชนิด อย่างไรก็ตามการใช้ SSN-1 cell line แยกเชื้อ nodaviridae ยังประสบปัญหาเนื่องพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อดังกล่าวมี C-type retrovirus แฝงอยู่ด้วย (Hart *et al.* 1996) ดังนั้นจึงในปี 2000 Iwamoto และคณะ จึงทำการโคลน (clone) เซลล์ SSN-1 ได้เซลล์ใหม่เป็น E-11 cell line ที่ปราศจาก C-type retrovirus นอกจากนี้ Chi *et al.* 1999 ได้ผลิต GF-1 cell line จากปลากะรัง (*Epinephelus coioides*) ที่สามารถยอมรับเชื้อ nodavirus ที่ทำให้เกิดโรคในปลากะรังได้ การศึกษาลำดับยีนของเชื้อโนดะไวรัสที่แยกได้จากปลาทะเลหลายชนิด พบว่าเชื้อโนดะไวรัสมีความแตกต่างกัน โดยสามารถจัดแบ่งกลุ่มตามลำดับยีนได้เป็น 4 กลุ่ม คือ striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), barfin

flounder necrosis virus (BFNNV), tiger buffer necrosis virus (TPNNV) และ red-spotted grouper necrosis virus (RGNNV) (Nishizawa *et al.* 1997b)

สำหรับในประเทศไทยมีการระบาดของโรคนี้ในปลากะรังตั้งแต่ปี 2526 แต่เริ่มมีรายงานสาเหตุการเกิดโรคว่าเกิดจากเชื้อไวรัสเข้าไปทำลายระบบประสาทตาและสมองเมื่อปี 2536 (เยาวินิตย์และคณะ, 2536) และมีการยืนยันว่าเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเป็นเชื้อ nodavirus เมื่อปี 2538 (Danayadol *et al.*, 1995) ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมายังไม่สามารถแยกและเพาะเชื้อไวรัสนี้ได้ และจากการติดตามข้อมูลการระบาดของโรคนี้พบว่ามีความรุนแรงเพิ่มขึ้นทุกปีและทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังพบมีการระบาดของโรคนี้ในพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอทะเลของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สงขลา ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าเพื่อทดลองแยกและเพาะเชื้อ nodavirus ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค VNN ในพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอทะเลรวมทั้งการศึกษาคูณลักษณะของไวรัสชนิดนี้ด้วย และเพื่อนำไวรัสที่เพาะเลี้ยงได้ไปศึกษาการแก้ปัญหาโรค การหาเทคนิคในการวินิจฉัยโรคที่นำไปใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลอดโรค

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

ตัวอย่างปลา(fish samples)

การเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอทะเลขนาดเฉลี่ย 7 กิโลกรัม ซึ่งมีอาการ สีลำตัวคล้ำ ท้องบวมและ งอตัวลอยบริเวณผิวน้ำ จากกระชังและพ่อแม่พันธุ์ปลา ของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง อ.เมือง จ.สงขลา ตัวอย่างที่เก็บนำมาตรวจวินิจฉัยโรคปรสิต แบคทีเรีย และตัดเก็บตัวอย่างสมองและตรวจรวมกันประมาณ 2 กรัม นำไปแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส

การแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส (virus isolation)

นำตัวอย่างสมองและตาข้างต้น มาบดด้วยโม่ร่งบด (mortar and pestle) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนละเอียด เติมน้ำด้วยสารละลาย Hanks' balance salt (HBSS) ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นปั่นที่ 4,000 รอบ/นาที กรองส่วนใฝ่ผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดตาเท่ากับ 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่กรองได้ไปเพาะเชื้อไวรัสในเซลล์เนื้อเยื่อ E-11 (Iwamoto *et al.* 2000) ในถาดเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (24 well plate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร จำนวนตัวอย่างละ 2 หลุม สำหรับชุดควบคุมใช้ HBSS แทนสารละลายไวรัสที่กรองได้ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทุกวัน เมื่อพบว่ามีการทำลายเซลล์ (cytopathic effect, CPE) จะเพาะเชื้อต่อไปอีก 2 ครั้ง (sub-passage) หลังจากเซลล์โดยทำลายนั้นแยกเซลล์ออกที่ 2,500 รอบ/นาที แบ่งสารละลายไวรัสดังกล่าวใส่หลอดเก็บเชื้อ (cryo-tubes) เก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ต่อไป

การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเชื้อไวรัส (virus partial properties)

การตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy)

ตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยวิธี negative staining โดยเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้ 100 ไมโครลิตร ในเซลล์เนื้อเยื่อ (E-11 cell) ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์ถูกทำลาย บ่มแยกเซลล์ออก นำสารละลายไวรัสที่ได้ปั่นตกตะกอนอนุภาคไวรัสที่ 25,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (ultracentrifuge) นำตะกอนไวรัสที่ได้ปั่นแยกไวรัสให้บริสุทธิ์ในสารละลายซีเซียมคลอไรด์ที่ความเร็ว 57,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ตรวจกับชั้น (band) ของอนุภาคไวรัสบริสุทธิ์และปั่นล้างด้วย

สารละลาย TE buffer (50mM Tris-base+2.5mM EDTA, pH 7.5) นำไวรัสบริสุทธิ์ที่ได้หยดลงบนแผ่น copper grid ที่เคลือบสาร formvar นาน 1-2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นด้วยวิธีหยดผ่าน 1-2 หยด และนำไปย้อมสีด้วย uranyl acetate ประมาณ 1 นาที ชั้ตามขอบ grid ให้แห้งด้วยกระดาษกรอง จากนั้นนำไปตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การคงสภาพของเชื้อไวรัสในตัวทำละลายไขมัน (sensitivity to lipid solvent)

ทดสอบตามวิธีของ Burleson และคณะ (1992) โดยผสมสารละลายไวรัสกับตัวทำละลายไขมันดังนี้

หลอดที่ 1 สารละลายไวรัส 1,000 ไมโครลิตร + สารคลอโรฟอร์ม (chloroform) 50 ไมโครลิตร

หลอดที่ 2 สารละลายไวรัส 1,000 ไมโครลิตร + สารละลาย Hanks' balance salt (HBSS) 500 ไมโครลิตร

หลอดที่ 3 สารละลาย Hanks' balance salt (HBSS) 1000 ไมโครลิตร + สารคลอโรฟอร์ม 500 ไมโครลิตร

ผสมแต่ละหลอดให้เข้ากัน 10 นาที โดยใช้เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) และปั่นแยกชั้นด้วยเครื่องเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นำน้ำส่วนบนไปทำ titration คำนวณหาปริมาณไวรัสในรูป TCID₅₀

วิเคราะห์ผลการทดสอบ

ทดสอบชนิดของกรดนิวคลีอิก (determination of nucleic acid type)

ทดสอบตามวิธีของ Rovozzo and Bruke (1973) ด้วยสารละลาย Hologenated pyrimidine 5-iodo-2-deoxyuridine (IUDR) และใช้ DNA virus และ RNA virus เป็นชุดเปรียบเทียบ โดยทำ titration เชื้อไวรัสที่ต้องการทดสอบในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96 well plate) ดังนี้

ไวรัสที่ต้องการทดสอบ : เพาะเลี้ยงเซลล์ E-11 ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร เมื่อเซลล์เจริญได้ 80 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นสารละลาย IUDR (10^{-4} M IUDR ใน HBSS) และเพาะเลี้ยงไวรัสลงไปที่ระดับต่างๆกัน โดยทำการเจือจางต่อเนื่องครั้งละ 10 เท่า (serial 10-fold dilution) หลังจากเพาะเชื้อไวรัสได้ 3 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจผลการทำลายเซลล์เป็นเวลา 7-14 วัน คำนวณหาค่า TCID₅₀ สำหรับในชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ใช้สารละลาย HBSS แทนสารละลาย IUDR ชุดเปรียบเทียบ ใช้เชื้อไวรัสที่มีกรดนิวคลีอิกชนิด ดีเอ็นเอ (Iridovirus) และเชื้อไวรัสที่มีกรดนิวคลีอิกชนิด อาร์เอ็นเอ (Rhabdovirus) ทดสอบเช่นเดียวกัน เปลี่ยนเฉพาะเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหมาะสมกับเชื้อไวรัสแต่ละชนิดเท่านั้น โดยเชื้อ iridovirus ใช้ epithelioma papulosum cyprini cell line (EPC) และ rhabdovirus ใช้ fathead minnow cell line (FHM)

การวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อไวรัส (Sequencing analysis)

ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาหมอทะเลเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสที่มีรายงานใน GenBank

สกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้ในเซลล์เนื้อเยื่อ (E-11 cells) ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร เมื่อเซลล์เริ่มถูกทำลาย ชูดเซลล์ออกและนำไปปั่นตกตะกอนที่ 2,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่รวบรวมได้ไปสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยชุดสกัด High Pure RNA Tissue Kit (Roche; Germany) ตามขั้นตอนของผู้ผลิต

สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาห่วงโซ่พหิเมอร์ไรส (PCR amplification)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปผ่านขบวนการปรับเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอให้เป็นสายดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยวิธี One-step reverse transcriptase poly-merase chain reaction (RT-PCR) ด้วยชุดทดสอบ SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen; USA) ใช้ไพรเมอร์คู่แรกคือ F1: CACAATGGTACGCAAAGGTG และ R1 : CCGAGTTGAGA

AGCGATCAG และ คู่ที่ 2 คือ F2 : TCGGCTGATACTCCTGTGTG และ R2 : TGAGGTGCCAGTAACAG

CA ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม primer3 โดยใช้ลำดับเบส (nucleotide sequence) ของเชื้อโนตะไวรัสสายพันธุ์ (genotype) RGNV รหัสนิวคลีโอไทด์ AY 721615.1 (GenBank) เป็นต้นแบบ ซึ่งไพรเมอร์ดังกล่าวให้สายดีเอ็นเอที่ประมาณ 1,410 เบส และ 305 เบส ตามลำดับ ในส่วนผสมสำหรับทำ RT-PCR (cocktail) ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ในหลอดสำหรับทำ PCR (PCR tube) ประกอบด้วย 0.2 mM dNTP, 1.2 mM MgSO₄, 0.01 uM forward primer, 0.01 uM reverse primer และ SuperScript™ III / Platinum® Taq Mix (Invitrogen), 100 pg Template RNA นำตัวอย่างที่เตรียมได้เข้าเครื่องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิอัตโนมัติ (automatic thermal cycle : Gene Amp® PCR System 2700) ดังนี้ 1 รอบ (cDNA) ที่ 42 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 90 องศาเซลเซียส 5 นาที 30 รอบ (PCR amplification): denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที 1 รอบ (Final extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 4 องศาเซลเซียส ตลอดไป หลังปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์นำไปตรวจวิเคราะห์ผลที่ได้ (analysis of PCR products) ด้วย 2% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอ ที่ทราบค่าแน่นอน (DNA marker) ตัดแบนด์ (band) ที่นำไปวิเคราะห์ลำดับเบส

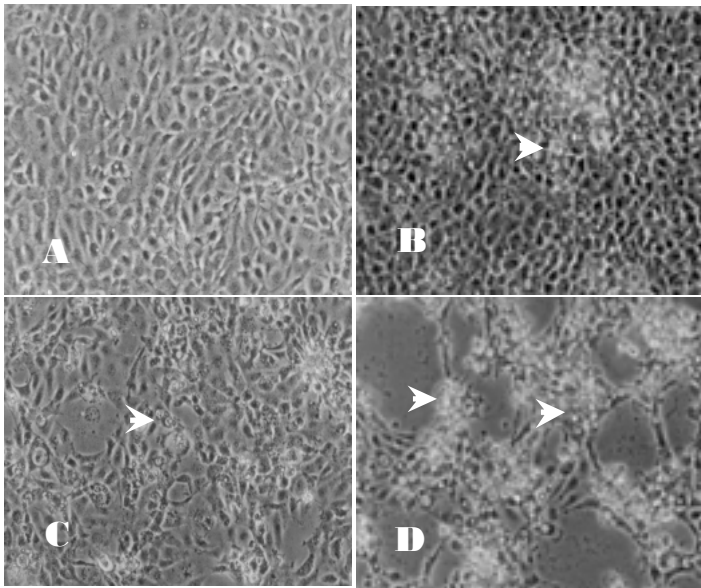
การวิเคราะห์ลำดับเบส (Nucleotide sequence analysis)

ผลที่ได้จากสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสที่แยกได้และเชื้อ SGNV นำไปทำให้สายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจล (The AN.A.P.™ Gel Purification kit; Invitrogen) นำสายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ฝากเข้าไปในเวกเตอร์และเพิ่มปริมาณด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ด้วย pCR® 8/GWTOPO® TA Cloning® kit (Invitrogen; USA) ตามขั้นตอนของผู้ผลิต จากนั้นนำแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีชิ้นส่วนของสายดีเอ็นเอดังกล่าว มาสกัดพลาสมิด (plasmid) ด้วยชุดสกัด High Pure Plasmid Isolation kit (Roche; Germany) ตามขั้นตอนของผู้ผลิต นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส ณ ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยีศูนย์บริการเครือข่ายชีววิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ด้วยเครื่อง ABI BigDry® Terminator System (Promega) และ ABI 377 DNA Sequencer นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อไวรัสที่มีรายงาน (submit) ใน GenBank ด้วยโปรแกรม บลาสท์ (Blast program; Altschul et al.1997)

ผลการศึกษา

การแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส (virus isolation)

พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสด้วยสารละลายที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตาและสมองลงในเซลล์เนื้อเยื่อ E-11 นาน 3 วัน เซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง (cytopathic effect, CPE) โดยเกิดช่องว่าง (vacuole) ภายในเซลล์ขึ้นและขยายเพิ่มมากขึ้น จนทำให้สังเกตเห็นเซลล์เป็นฟองอากาศ ภายใน 4 – 6 วัน เซลล์ก็จะถูกทำลายหมด (ภาพที่ 1)

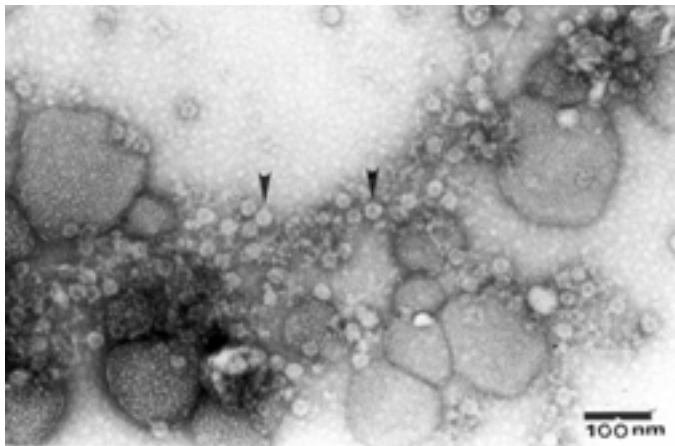


ภาพที่ 1 ลักษณะการทำลายเซลล์ E-11 ของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรค VNN ในปลาหมอทะเล

- A : ลักษณะของเซลล์ E-11 ปกติ
 B: ลักษณะ ภายในเซลล์เริ่มเกิด vacuole หลังจากเพาะเชื้อไวรัสนาน 3 วัน (ลูกศร)
 C : ภายในเซลล์เกิด vacuole เพิ่มมากขึ้น ในวันที่ 4 หลังจากเพาะเชื้อไวรัส (ลูกศร)
 D: เซลล์เนื้อเยื่อส่วนใหญ่ถูกทำลายและเกิด vacuole ขนาดใหญ่ขึ้น (ลูกศร) หลังจากเพาะเชื้อไวรัส นาน 6 วัน

การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเชื้อไวรัส (virus partial properties)

เมื่อนำสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ มาตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัส (virus particle) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 27-30 นาโนเมตร มีรูปร่างเป็นเหลี่ยมแบบ icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelope) (ภาพที่ 2)



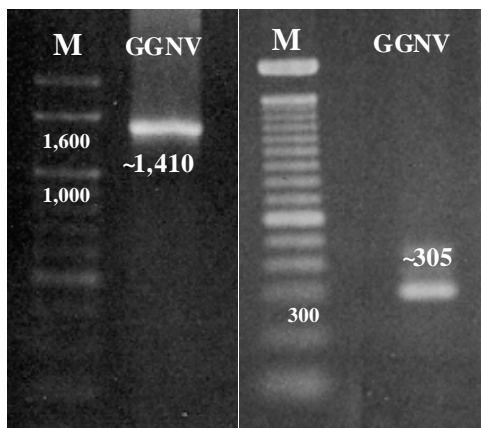
ภาพที่ 2 ลักษณะรูปร่างอนุภาคไวรัสซึ่งนำมาจากการเพาะเลี้ยงใน E-11 ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า มีรูปร่างแบบ icosahedral ขนาด 25 -30 นาโนเมตร (Bar = 100 nm; 50000X)

ผลการศึกษารูปร่างของเชื้อไวรัสที่แยกได้ในตัวทำละลายไขมันพบว่า ค่าความสามารถในการทำลายเซลล์ของเชื้อไวรัส ($TCID_{50}$) ที่สัมผัสและไม่ได้สัมผัสกับตัวทำละลายไขมัน มีค่าไม่แตกต่างกันโดยมีค่าเท่ากับ $8.0 \log_{10} TCID_{50}/ml$ และ $8.04 \log_{10} TCID_{50}/ml$ ตามลำดับ เนื่องจากองค์ประกอบของเปลือกหุ้ม (envelope) ของอนุภาคไวรัสจะประกอบด้วยไขมัน ดังนั้นผลการศึกษาดังนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสแยกได้ เป็นเชื้อไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelope virus)

ผลการทดสอบพบว่าสารประกอบ IUDR มีผลต่อความสามารถในการทำลายเซลล์โดยชุดทดสอบที่บ่มด้วยสารละลาย IUDR ให้ค่า TCID₅₀ เท่ากับ 7.6 log₁₀ TCID₅₀/ml ขณะที่บ่มด้วยสารละลาย IUDR มีค่าเท่ากับ 8.1 log₁₀ TCID₅₀/ml ในขณะที่ชุดควบคุมที่เชื้อไวรัสมีกรดนิวคลีอิกเป็นชนิด อาร์ เอ็น เอ ให้ค่าความสามารถในการทำลายเซลล์ของเชื้อไวรัสที่บ่มด้วยสารละลาย IUDR และไม่บ่มด้วยสารละลาย IUDR เท่ากับ 6.8 log₁₀ TCID₅₀/ml และ 7.5 log₁₀ TCID₅₀/ml ตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมที่เชื้อไวรัสมีกรดนิวคลีอิกเป็นชนิด ดี เอ็น เอ ให้ค่าความสามารถในการทำลายเซลล์ของเชื้อไวรัสที่บ่มด้วยสารละลาย IUDR และไม่บ่มด้วยสารละลาย IUDR เท่ากับ 4.8 log₁₀ TCID₅₀/ml และ 7.6 log₁₀ TCID₅₀/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความแตกต่างของค่า TCID₅₀ ระหว่างเชื้อไวรัสที่บ่มด้วยสารละลาย IUDR กับที่ไม่บ่มด้วยสารละลาย IUDR ของเชื้อไวรัสมีกรดนิวคลีอิกเป็นชนิด ดี เอ็น เอ มีค่ามากกว่า 2.0 log₁₀ TCID₅₀/ml ขณะที่ของเชื้อไวรัสมีกรดนิวคลีอิกเป็นชนิด อาร์ เอ็น เอ มีค่าไม่เกิน 2.0 log₁₀ TCID₅₀/ml ดังนั้นผลการทดสอบในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้มีกรดนิวคลีอิกเป็นชนิด อาร์ เอ็น เอ

การวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อไวรัส (Sequencing analysis)

ผลการสกัดอาร์เอ็นเอของตัวอย่างเชื้อไวรัสที่แยกได้ในครั้งนี้ให้รหัสเชื้อเป็น GGNV และเชื้อ SGNV และเมื่อผ่านกระบวนการเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอและเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดที่ 1 Forward : CACAATGGTACGC AAAGGTG และ Reverse : CCGAGTTGAGAAGC GATCAG และชุดที่ 2 Forward : TCGGCTGATACTCCTGTGTG และ Reverse : TGAGGTGCCAGTAA ACAGCA ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตของเครื่อง UV-transluminator พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาหมอทะเล ให้ผลการทดสอบในชุดที่ทดสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อโนดะไวรัสที่ 1,410 เบส และชุดที่ทดสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อโนดะไวรัสที่ 305 เบส สามารถแสดงผลที่ประมาณ 1,410 และประมาณ 305 เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาหมอ

ทะเล(GGNV) ปฏิกริยาห่วงโซ่พอลิเมอร์ไรส (PCR amplification)

M = แถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบที่ทราบค่า

แน่นอน (DNA marker)

ผลจากการทำปฏิกิริยาจัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อโนตะไวรัสที่ 1,410 เบส พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถอ่านค่าได้ในช่วงต้นและช่วงปลายของสายดีเอ็นเอประมาณ 630 และ 613 เบส ตามลำดับ ในขณะที่ผลการทำปฏิกิริยาจัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อโนตะไวรัสที่ 305 เบส สามารถอ่านค่าได้ประมาณ 226 เบส เมื่อนำลำดับเบสของสายดีเอ็นเอทั้งสามช่วงมาต่อกัน (fill gap) ทำให้ได้สายดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสที่แยกได้เท่ากับ 1,333 เบส (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 แสดงลำดับเบสของสายดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาหมอตทะเล (GGNV) จากการทำปฏิกิริยาจัดลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อโนตะไวรัสที่ประมาณ 1,410เบส และประมาณ 305 เบส

GCGACAC CAA	GGCCGCGAAT	CCGCAACCCC	GCCGACGTGC	GCCGACGTGC	GCCGACGTGC	ATCGCACTGA
CGCACCTGTG	TCTAAGGCCT	CGACTGTGAC	TGGAITTGGA	CGTGGGACCA	ATGACGTCCA	TCTCTCAGGT
ATGTCGAGAA	TCTCCCAGGC	CGTCTCCCA	GCCGGGACAG	GAACAGACGG	ATACGTTGTT	GTTGACGCAA
CCATCGTCC	CGACCTCCTG	CCACGACTGG	GACATGCTGC	TAGAATCTC	CAGCGATACG	CTGTTGAAAC
ACTGGAGTTT	GAAATTCAGC	CAATGTGCC	CGCAAACACG	GGCGGTGGTC	ACGTTGCTGG	CTTCTGCCT
GATCCAACTG	ACAACGATCA	CACCTTCGAC	GCGCTTCAAG	CAACTCGTGG	TGCAGTCGTT	GCCAAATGGT
GGGAAAGCG	AACAGTCCGA	CCTCAGTACA	CCCGCACGCT	CCTCTGGACC	TGTCGGGAA	AGGAGCAGG
TCTCACGTCA	CCTGGTCGGC	TGATACTCCT	GTGTGTCCGC	AACAACACTG	ATGTGGTCGA	CGTGTCAGTG
CTTTGTCGCT	GGAGTGTTCC	ACTGAGCGTT	CCATCTCTTT	GAGACACCTG	AAGAGACCAC	CGCTCCCATC
ATGACACAAG	GTTCTGTAC	ACGATCCCT	TTCACAAATG	ACTTCAAGTC	CATCCTCCTA	GGATCACACC
ACTGGAATTG	CCCTGATGG	AGCAGTCTGC	CAGCTGGATC	GTCCGCTGTC	CCATGGACTA	CAGCCTTGGA
GCTGGAGATG	TTGACCGTGC	TGTTTATTGG	CACCTCAAGA	AGTTTGTGG	AAATGCTGGC	ACACCTGCAG
GCTGGTTTCG	CTGGGGCATC	TGGGACAAC	TTAACAAAGAC	GTTTACAGAT	GGCGTTGCGT	ACTACTCTGA
TGAGCAGCCC	CGTCAAATCC	TGCTGCCTGT	TGGCACTGTC	TGCACCAGGG	TTGACTCGGA	AACTAACCG
GGTCATCCGG	TTCCCTAGTG	CGTATCGTTG	ATGACCAATT	TGAACAATTG	ATTAAAGCAC	TAACAAATAT
AAATAAAGAA	ATACAACAA	ACAAAAC	AATTGGAAAG	AATAGAAGCG	AAATTGAATC	ACTCGCTAGC
AAATTAAACG	ACAAGCAC	CAAGGAGGGT	GCGATTGCTA	TTGTTGGTAC	CCTTGACGGC	GTACCGGCTA
CGCTTGAAGG	CCTATACACG	GCTGGAAGCG	CGCCGCGTC	TTGATTGGGT	GCCAGTGATA	CCAGTCGTAT
CCAACGCGA	GGAAGTCCCT	CTTTGGGCTG	TTGGGTTACC	GTTAGCTCCG	CGCAGTGAGC	ACCACCGCCA
TGG						

เมื่อนำลำดับเบสของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาหมอตทะเลเปรียบเทียบกับเชื้อโนตะไวรัสในกลุ่ม red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV), striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), barfin flounder nervous necrosis virus (BFNNV) และ tiger buffer nervous necrosis virus (TPNNV) ที่มีรายงานใน GenBank ด้วยโปรแกรม บลอสท์ (Blast program; Altschul et al. 1997) พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้มีลำดับเบสของสายดีเอ็นเอเหมือนกันอยู่ 98 78 83 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากปลาหมอตทะเล น่าจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อโนตะไวรัสที่แยกได้จากปลาหมอทะเลกับเชื้อโนตะไวรัสที่แยกได้จากปลาหมอทะเลและเชื้อโนตะไวรัสในกลุ่มอื่นๆ โปรแกรมบลาสท์ (Blast program; Altschul et al.1997)

กลุ่มเชื้อไวรัส	%ลำดับเบสที่เหมือนกัน (% nucleotide homology)	อ้างอิง
RGNNV(AF281657)	98 (1308/1334) gap 8	Hegde et al. 2002
SJNNV(D30814)	79 (1092/1381) gap 110	Nishizawa et al. 1995
BFNNV (D38635)	83 (700/840) gap 27	Nishizawa et al. 1995
TPNNV (D38637)	78 (653/837) gap 15	Nishizawa et al. 1995

สรุปและวิจารณ์ผล

การแยกและเพาะเชื้อไวรัสโดยใช้ E-11 cell line ในครั้งนี้พบว่าลักษณะการทำลายเซลล์ของเชื้อไวรัส (CPE) มีลักษณะที่เซลล์มีจำนวน vacuole ภายในเซลล์จำนวนมาก จนกระทั่งเซลล์มีลักษณะกลมคล้ายฟองอากาศ ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังจากเพาะเชื้อไวรัสนาน 3 วัน ลักษณะการทำลายเซลล์เช่นนี้เหมือนกับลักษณะการทำลายเซลล์ของไวรัสในภาพเพาะเชื้อ nodaviridae ที่ทำให้เกิดโรคในปลา sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Frerichs et al.,1996) รวมทั้งการศึกษายอมรับการย้อมรับเชื้อ nodaviridae สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากปลาทะเล 13 ชนิด (*Epinephelus akaara*, *E. septemfasciatus*, *E. moara*, *E. coioides*, *Dicentrarchus labrax*, *Lates calcarifer*, *Oplegnathus punctatus*, *Paralichthys olivaceus*, *Pseudocaranx dentex*, *P. olivaceus* *Takifugu rubripes*, *Gadus macrocephalus* และ *Hippoglossus hippoglossus*) โดยใช้ SSN-1 cell line เช่นกัน (Iwamoto et al., 1999) และผลจากการศึกษาคูณสมบัติบางประการพบว่า เชื้อไวรัสที่แยกและเพาะเลี้ยงได้ครั้งนี้สามารถคงสภาพต่อสารตัวทำลายไขมันและสารถละลาย IUDR และมีรูปร่าง แบบ icosaheral ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-30 นาโนเมตร เหมือนกับอนุภาคของไวรัสที่พบในปลาอื่นๆ หลายชนิดที่นักวิจัยจากประเทศอื่นได้ศึกษามาเช่นใน ปลากะรัง *Epinephelus fuscogutatus* และ *E. akaara* ในไต้หวัน (Chi et al. 1997) ปลา sea bass *Dicentrarchus labrax* ในประเทศอิตาลี (Bovo et al. 1999) จากการศึกษาการยอมรับเชื้อ nodaviridae ของ SSN-1 cell line โดย Iwamoto และคณะในปี 1996 พบว่า ระยะเวลาและลักษณะการเกิด CPE ตลอดจนอุณหภูมิที่เข้ามเชื้อของเชื้อ nodaviridae สายพันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างกัน บางสายพันธุ์มีการทำลายเซลล์รุนแรงในระยะเวลานานสั้น (10-14 วัน) ในขณะที่บางสายพันธุ์ไม่พบการทำลายเซลล์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25°C (AHNor96, เชื้อ nodaviridae ที่แยกได้จากปลา *Hippoglossus hippoglossus*) สำหรับเชื้อ nodaviridae สายพันธุ์ GNNV 9508 (Chi et al., 1999) และสามารถคงสภาพอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 2 ชม. ซึ่งต่างจาก nodaviridae ที่แยกได้จากปลา seabass (*Dicentrarchus labrax*) (Frerichs et al., 2000) ที่สามารถคงสภาพอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 56°C เพียง 1 ชม. นอกจากนี้ เซลล์ SSN-1 มีเชื้อ retrovirus แฝงอยู่ (Frerichs et al., 1991) ดังนั้น Iwamoto และคณะ (2000) จึงได้โคลน (Clone) เซลล์ดังกล่าวได้เซลล์เนื้อเยื่อใหม่ที่ไม่มี C-type retrovirus ซึ่งตั้งชื่อเซลล์เป็น E-11 cell line

การจัดกลุ่มหรือจำแนกชนิดของไวรัส ตามวิธีของ Van Regenmortel และคณะ (2000) พบว่าเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในครอบครัว nodaviridae มีอยู่ 2 สกุล (genera) คือ alfanodavirus เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในแมลง และ betanodavirus เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ คุณสมบัติของเชื้อไวรัสในครอบครัวนี้จะมีกรดนิวคลีอิก เป็นชนิดอาร์เอ็นเอ รูปร่างแบบเหลี่ยมชนิด

icosahedral มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-30 นาโนเมตร ยีนประกอบด้วย อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 2 เส้น เส้นแรกไม่สร้างโปรตีนความยาวประมาณ 3,000 เบส เส้นที่ 2 ให้โปรตีนที่มีความยาวประมาณ 1,400 เบส ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-envelope) จากการศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีและทางกายภาพของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอทะเลในครั้งนี้มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับคุณสมบัติที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งสรุปเบื้องต้นได้ว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้น่าจะอยู่ในกลุ่มเชื้อโนตะไวรัส

นับตั้งแต่ Nishizawa และคณะ (1994) ได้นำเอาเทคนิคการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์น้ำด้วยปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR) มาศึกษาเชื้อโนตะไวรัสที่ก่อโรคในปลา โดยออกแบบไพรเมอร์ จากลำดับเบสของสายดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่เปลี่ยนมาจากสายอาร์เอ็นเอที่ให้โปรตีนของเชื้อโนตะไวรัสสายพันธุ์ SJNNV เพื่อใช้เพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอสังเคราะห์จำเพาะที่ประมาณ 180 เบส และ 430 เบส ทำให้มีการใช้เทคนิคดังกล่าวอย่างกว้างขวางทั้งในแง่การตรวจหาสาเหตุของการเกิดโรค (Chi *et al.* 1997; Thiery *et al.* 1999.; Zafan *et al.* 2000.; Lin *et al.* 2001) และการศึกษาในระดับโครงสร้างทางโมเลกุลของเชื้อโนตะไวรัสของ Nishizawa และคณะ (1997b) พบว่าเชื้อโนตะไวรัสมีความแตกต่างกัน โดยสามารถจัดแบ่งกลุ่มตามลำดับยีนได้เป็น 4 กลุ่ม คือ striped jack nervous necrosis virus (SJNNV), barfin flounder necrosis virus (BFNNV), tiger flounder necrosis virus (TFNNV) และ red-spotted grouper necrosis virus (RGNNV) ซึ่งในการศึกษาในครั้ง พบว่าผลการทดสอบด้วยปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอไรเซชัน (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อโนตะไวรัสที่ 1,410 เบส ให้ผลการทดสอบที่ประมาณ 1,410 เบส เช่นกันกับเชื้อโนตะไวรัสที่แยกได้จากลูกปลากะรังดอกแดงในพื้นที่จังหวัดสงขลาและมีลำดับเบสที่เปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อโนตะไวรัสสายพันธุ์อื่นหรือที่แยกได้จากปลาชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอทะเลเป็นเชื้อโนตะไวรัสสายพันธุ์ RGNNV เนื่องจากมีความแตกต่างของเชื้อไวรัสดังกล่าว ดังนั้นการใช้เทคนิค PCR ในการศึกษาจึงต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะหรือเหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ เช่นการศึกษาเชื้อโนตะที่ก่อโรคในปลาหมอทะเลในประเทศอิสราเอล (Ucko *et al.* 2004) หรือใช้เทคนิคดังกล่าวร่วมกับเทคนิคอื่นๆ เช่น ELISA (Huang *et al.* 2001)

เอกสารอ้างอิง

- เยาวินิตย์ ดนยดล สถาพร ดิเรกบุษราคม และกิจการ ศุภมาตย์. 2536. โรคอัมพาตในปลากะรังจุดน้ำตาล *Epinephelus malabaricus*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2536. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 11 หน้า.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, Aa., Zhang, T., Miller, V. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Breuil, G., Bonami, J.R., Pepin, J.f. and Pichot, Y. 1991. Viral infection (picorna-like virus) Associated with mass mortalities in hatchery reared (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*. 97 : 109-116.
- Burleson, F.G., Chambers, T.M. and Wedbrauk, D.L.1992. *Virology : a Laboratory Manual*. Academic Press, London.
- Bovo, G., Nishizawa, T., Maltese, C., Borghesan, F., Mutinelli, F., Montesi, F. and De Mas., S. 1999. Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus Research*. 63 : 143-146.

- Comps, M., Pepin, J.F. and Bonami, J.R. 1994. Purification and characterization of two fish encephalitis virus (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*. 123:1-10.
- Chi, S.C., Lo, C.F., Kou, G.H., Chang, P.S., and Chen, S.N. 1997. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuseogutatus* and *Epinephelus akaara*. *Journal of Fish Diseases* 20:185-193.
- Chi, S.C., Lin, S.C., Su, H.M. and Hu, W.W. 1999. Temperature effect on nervous necrosis Virus infection in grouper cell line and in grouper larvae. *Virus Research* 63:107-114.
- Danayadol, Y., Direkbusarakom, S. and Supamattaya, K. 1995. Virus nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, in cultured in Thailand. *In Diseases in Asian Aquaculture II* M. Shariff, J., R. Arthur & R.P. Subasinghe (eds). 227-233. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Dannevig, B.H., Niksen, R., Mondahl, I., Jankowske, M., Taksdal, T. and McL, C. 2000. Isolation in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus Hippoglossus* in Norway. *Disease Aquatic Organism* 43:183-189.
- Frerichs, G.N., Roger, H.D. and Peric, Z. 1996. Cell culture isolation of piscine Neuroathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology*. 77:2067-2071.
- Frerichs, G.N., Tweede, A., Starkey, W.G. and Richards, R.H. 2000. Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant in activation of seabass (*Dicentrarchus labrax*) neuroathy nodavirus. *Aquaculture* 185:13-24.
- Grotmol, S., Bergh, O. and Totland, G.K. 1990. Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in organ and possible route of infection. *Disease Aquatic Organism* 36:95-106.
- Grotmol, S., Totland, G.K., Kvellestad, A., Fjell, K. and Olsen, AB. 1995. Mass mortality of larvae and juvenile hatchery-rearing halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) associated with the presence of virus-like particles in vacuolated lesions in the central nervous necrosis system and retina. *Bulletin Europe Association Fish Pathology* 15: 176-180.
- Hart, D., Frerichs, GN., Rambaut, A. and Onions, DE. 1996. Complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the snapper fish retrovirus. *Journal of Virology* 70: 3606-3616.
- Hegde, A., Chen, C.L., Qin, Q.W., Lam, T.J. and Siu, Y.M. 2002. Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore. *Aquaculture* 213:55-72.

- Huang, U., Tan, C., Chang, S.F., Mnday, B., Mathew, J.A, Ngoh, G.H. and Kwang, J. 2001. Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). Using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases* 24:135-141.
- Iwamoto, T., Mori, K., Arimoto, M. and Nakai, T. 1999. High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Disease Aquatic Organism* 39:37-47.
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M. and Furusawa, I. 2000. Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Disease Aquatic Organism* 43:81-89.
- Lin, L., He, J., Nishioka, T., Wu, J.L., Weng, S., Mushiake, K., Arimoto, M. and Nakai, T. 2001. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China. *Fish pathology* 36(3):186-188.
- Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T. and Kanno, T. 1991. A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathology* 26:209-210.
- Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. and Furusawa, I. 1992. Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larvae striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Journal of Virology* 187:368-371.
- Munday, B.L., Langdon, J.S. Hyatt, A. and Humphrey, J.D. 1992. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larvae and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*. 103:197-211.
- Nguyen, H.D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nishizawa, T. and Muroga, K. 1994. Occurrence of viral nervous necrosis(VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys divaceus*. *Fish Science* 60:551-554.
- Nishizawa, T., Mori, K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I. and Moruga, K. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Disease of Aquatic Organism* 18:103-107.
- Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nakai, T. and Moruga, K. 1997b. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4):1633-1639.
- Rovazzo, G.C. and Burke, C.N. 1973. *A Manual of Basic Virological Techniques*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New York.
- Schneemann, A., Reddy, V. and Johnson, J.E. 1998. The structure and function of nodavirus particles : a paradigm for understanding chemical biology. *Advance Virology Research* 50:381-446.
- Thiery, R., Arnould, C. and Delsert, C. 1999. Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *Journal of Fish Diseases* 22:201-207.

- Ucko, M., Cobrmi, A. and Diamant, A. 2004. Nodavirus infections in Israeli mariculture. *Journal of Fish Diseases*. 27(8):459-469.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M, Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K, Lemen S.M., Maniloff, J., Mayo, M,A, McGeoch D.J., Pringle C.R. and Wickner, R.B. 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. Academic Press, New York, N.K.
- Yoshikoshi, K. and Inoue, K. 1990. Viral nervous necrosis in hatchery reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplethut fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*. 13:63-77.
- Wanatabe, K., Yoshimizu, M., Ishima, M., Kawamata, K. and Ezura, Y. 1999. Occurrence of viral nervous necrosis in hatchery-reared barfin flounder. *Bulletin Faculty Fish Hokkaido University* 50:101-113.

