

ลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่บ่งชี้การติดเชื้อโรคหางขาว ในลูกกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* De Man)

Histopathological Index of White Tail Disease Infected in Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) Larvae

ดร.ศุภมาศ ศรีวงศ์พุท¹
Dr.Supamas Sriwongpuk¹

บทคัดย่อ

ลูกกุ้งก้ามกรามจากโรงเพาะฟักในอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรีที่ป่วยเป็นโรค หางขาว จะมีกล้ามเนื้อเป็นสีขาวขุ่นคล้ายสีน้ำมันที่บริเวณส่วนหลัง ด้านท้อง หรือปลายส่วนหาง เป็นสาเหตุทำให้ลูกกุ้งมีอัตราการการตายสูงมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อวิจัยลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่บ่งชี้การติดเชื้อโรคหางขาวในลูกกุ้งก้ามกราม ซึ่งสามารถนำมาใช้ประกอบการตรวจวินิจฉัยและใช้เป็นตัวบ่งชี้การติดเชื้อโรคหางขาวในลูกกุ้งก้ามกราม ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสชนิด *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) และ Extra Small Virus (XSV) ได้โดยจะพบอินคลูชัน บอดี้ส์ (inclusion bodies) ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งบอกว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัสจำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่ชัดเจนที่สุด 2 ลักษณะ คือ อินคลูชัน บอดี้ส์ที่พบในนิวเคลียสย้อมติดสีชมพู (acidophilic intranuclear inclusion) บริเวณกลุ่มเซลล์ที่ตายแล้ว หรือมีลักษณะแบบ Cowdry type A และอินคลูชัน บอดี้ส์ที่เกิดขึ้นในส่วนของไซโทพลาสซึมซึ่งย้อมติดสีน้ำเงิน (basophilic cytoplasmic inclusion) นอกจากนี้ยังพบการตายของเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle necrosis) บริเวณมัดกล้ามเนื้อที่ส่วนหลังส่วนท้องและส่วนหาง

คำสำคัญ : พยาธิสภาพเนื้อเยื่อ, โรคของลูกกุ้งก้ามกราม, โรคหางขาว, ไวรัส

¹ อาจารย์ประจำคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์



ABSTRACT

Giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) larvae in the hatchery from Amphor Song Pae – Nong, Supanburi Province were infected with White Tail Disease. They showed abnormal body discoloration looked like white body opacity. The surviving reached to 100

percent. The purpose of the research is to analyse the histopathological changes of White Tail

Disease infected with *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) and Extra Small Virus (XSV). It was found that affected larvae had areas of moderate striated muscle necrosis. There were two types of inclusion bodies in their hepatopancreas; acidophilic intranuclear inclusion or Cowdry type A and basophilic cytoplasmic inclusion. There were also areas of necrosis cells in the striated muscle of the dorsal, appendages of abdomen and the tail.

Key Words : Histopathological changes, Disease of Giant freshwater prawn, White Tail Disease, Virus

บทนำ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยเฉพาะเพศผู้ เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ ในปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในพื้นที่ภาคกลางประมาณ 80,000 ไร่ ประกอบด้วยเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งประมาณ 5,000 ราย โดยเฉพาะในจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม และจังหวัดราชบุรี ผลผลิตกุ้งก้ามกรามประมาณร้อยละ 70 ใช้สำหรับการบริโภคภายในประเทศ และมีการส่งออกประมาณร้อยละ 30 ประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปเป็นผู้ซื้อรายใหญ่ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523 ซึ่งเป็นปีเริ่มต้นของการดำเนินการส่งเสริมและขยายการเพาะเลี้ยงกุ้งของกรมประมง (ธีรพันธุ์ ภูคาสุวรรณ, 2523) และจากนั้นเป็นต้นมาก็ได้มีการปรับปรุงแก้ไข และพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามให้เจริญก้าวหน้ามากขึ้นเป็นลำดับ อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่เป็นอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามก็คือการเกิดโรค โดยเฉพาะในช่วงระยะอนุบาลลูกกุ้ง ซึ่งในปี พ.ศ. 2529-2531 การอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามเกิดปัญหาหลังจากลูกกุ้งเริ่มคว่ำจนกระทั่งคว่ำหมดหรือในช่วงที่ลูกกุ้งมีอายุตั้งแต่ 13-35 วัน ปัญหาที่เกิดขึ้นคือกุ้งเป็นโรคตัวขาว ตัวสีชมพู กุ้งตายไม่ทราบสาเหตุ และเมื่อนำไปตรวจพิสูจน์ไม่พบเชื้อโรค ตลอดจนกุ้งไม่ลอกคราบ กุ้งไม่โต ซึ่งมีผลทำให้อัตราการรอดตายต่ำ (โสภา อาริรัตน์ และสมเกียรติ กาญจนาคาร, 2531)

โรคหางขาว (White tail disease หรือ WTD) เป็นโรคหนึ่งที่เป็นปัญหามากต่อลูกกุ้งก้ามกราม ซึ่งปีโรคชนิดเดียวกับที่มีรายงานการพบในปี ค.ศ. 1997 ใน Guadeloupe (Arcier et al., 1999) หลังจากนั้นพบใน Martinique (French West Indies) ประเทศอินเดีย (Salin and Nair, 2003) ประเทศไต้หวัน (Tung et al., 1999) ประเทศจีนในจังหวัด Zhejiang, Jiangsu, Guangdong และ Shanghai (Qian et al., 2003) และในประเทศไทย (Yoganandhan et al., 2005) โรคหางขาวนี้สร้างความเสียหายให้กับลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักโดยลูกกุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของลูกกุ้งที่ติดเชื้อมีอาการกล้ามเนื้อสีขาวโดยเฉพาะบริเวณหางเช่นเดียวกับรายงานของ Sahul Hameed et al. (2004) ซึ่ง Qian et al. (2003) พบว่ามีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV) และชนิดที่สองคือ Extra small virus (XSV)

โรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการพัฒนาและขยายธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามอย่างมาก สำหรับในประเทศไทยในช่วง 5-6 ปีที่ผ่านมา มีลูกกุ้งก้ามกรามเป็นโรคและตายเป็นจำนวนมากใน



ทุกพื้นที่ จากปัญหาเรื่องโรคดังกล่าวข้างต้นทำให้ลูกกุ้งก้ามกรามที่ผลิตออกมามีไม่เพียงพอกับจำนวนความต้องการของเกษตรกร นอกจากนี้เมื่อนำลูกกุ้ง ที่เหลือรอดไปเลี้ยงในบ่อ กุ้งบางส่วนเป็นโรคตาย ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่ประสบปัญหาการขาดทุน เนื่องจากยังมีการวิจัยเกี่ยวกับการตายของลูกกุ้งที่เกิดขึ้นดังกล่าวยังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการวิจัยหาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อเพื่อใช้ประกอบการตรวจวินิจฉัยโรคของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อโรคทางขาว อันจะเป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

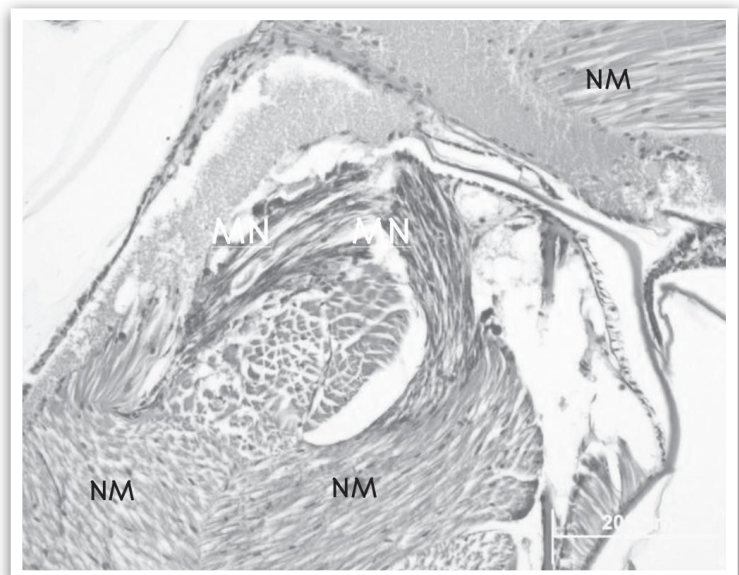
นำตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัสโรคทางขาว จากโรงเพาะฟักลูกกุ้งในอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์สาเหตุของเชื้อโดยวิธี RT-PCR ตามวิธีการของ Sahual Hameed et al. 2004. ไปดองในน้ำยา Davidson's fixative เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างตามวิธีการของ Bell and Lightner (1988) โดยนำเนื้อเยื่อตัวอย่างมาบรรจุใน embedding cassette แล้วนำมาผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) การ clearing และการ infiltration ด้วยเครื่อง automatic processor หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ได้มาใส่ลงในแม่พิมพ์ (mold) เพื่อทำให้เป็นแท่งด้วยการเติมพาราฟินลงไป นำแท่งขึ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่ได้มาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน นำมาวางลงบนแผ่นสไลด์ หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ติดสไลด์ดีแล้วไปย้อมสี haematoxylin และ eosin (H&E) ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้น้ำยา permount แล้วนำสไลด์ถาวรที่ได้มาศึกษาลักษณะต่างๆ ของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงต่อไป

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

จากการวิจัยพบว่าลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเป็นโรคทางขาว (White tail disease หรือ WTD) จากการติดเชื้อไวรัสชนิด MrNV และ XSV มีลักษณะลำตัวสีขาวขุ่นคล้ายสีนํ้านมที่บริเวณส่วนหลัง ด้านท้อง หรือปลายส่วนหาง (ภาพที่ 1)



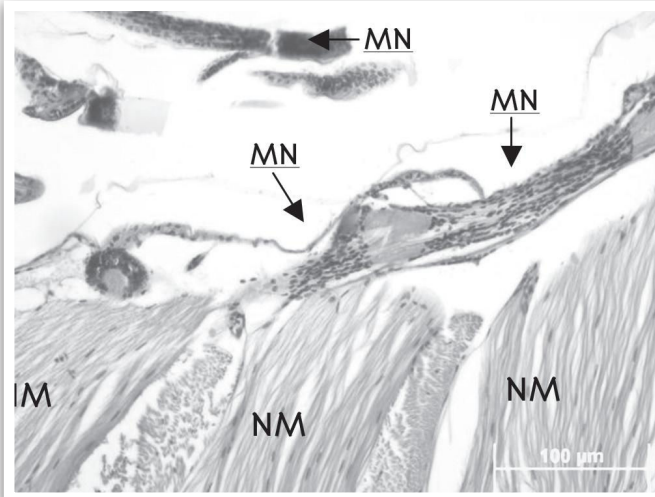
ภาพที่ 1 ลักษณะของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วย มีลำตัวสีขาวขุ่น



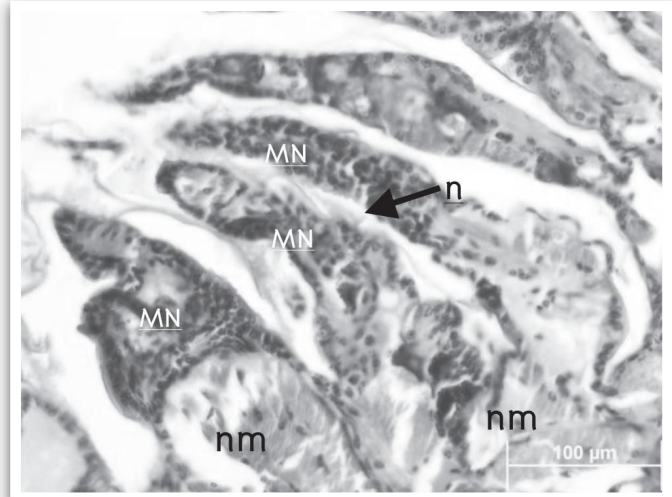
ภาพที่ 2 กล้ามเนื้อบริเวณลำตัวที่เกิดการตาย (MN) แทรกตัวรวมอยู่กับกล้ามเนื้อที่ปกติ (NM) (H&E; bar = 200 μ m)

เมื่อนำลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยเหล่านี้มาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบการเปลี่ยนแปลงในอวัยวะต่างๆ ดังนี้ คือ พบกล้ามเนื้อตาย (muscle necrosis) กระจายอยู่เป็นส่วนของ โดยเฉพาะมัดกล้ามเนื้อที่บริเวณลำตัว (ภาพที่ 2) ที่ส่วนท้อง (ภาพที่ 3) และที่ส่วนของระยางค์ต่างๆ (ภาพที่ 4) ของลูกกุ้ง จะเห็นนิวเคลียสของกล้ามเนื้อลาย

ติดสีน้ำเงินเข้มจำนวนมาก จากการย้อมสีด้วยฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน (H&E) แตกต่างจากกล้ามเนื้อปกติซึ่งนิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินแต่จางกว่า และอยู่ห่างๆ กันทำให้มองเห็นเฉพาะในส่วนของไซโทพลาสซึมซึ่งจะติดเฉพาะสีชมพูอย่างชัดเจน (ภาพที่ 4) และพบว่าบริเวณกล้ามเนื้อที่เกิดการตายเหล่านี้จะมีฮีโมไซต์ (hemocyte) แทรกตัวเข้ามาเพิ่มเป็นจำนวนมาก

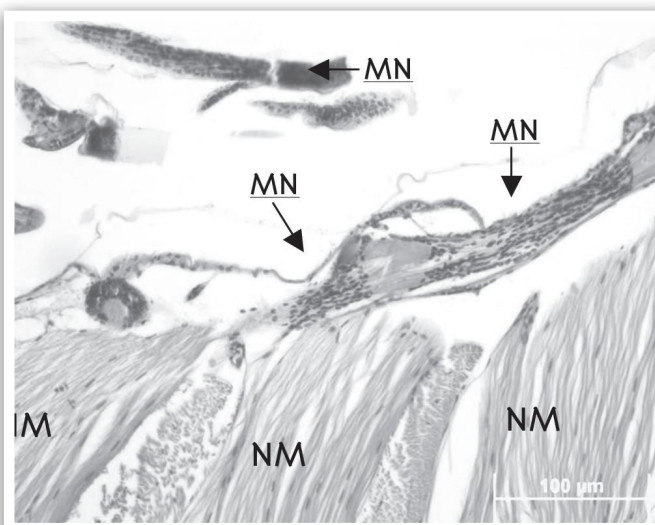


ภาพที่ 3 กล้ามเนื้อบริเวณด้านท้องที่เกิดการตาย (MN) แทรกตัวรวมอยู่กับกล้ามเนื้อปกติ (NM) (H&E; bar = 100 μm)

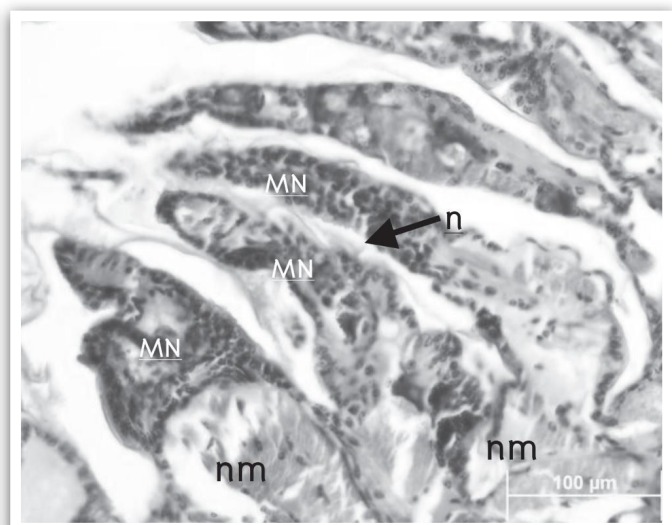


ภาพที่ 4 ภาพขยายกล้ามเนื้อบริเวณระยะที่ที่เกิดการตาย (MN) จะเห็นนิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม (n) แทรกตัวรวมอยู่กับกล้ามเนื้อปกติ (NM) ซึ่งเห็นเป็นสีชมพู (H&E; bar = 100 μm)

นอกจากนี้ยังพบว่าพยาธิสภาพเนื้อเยื่อส่วนของตับและตับอ่อน (hepatopancreas หรือ hp) มีขนาดเล็กลง (atrophy) มีปริมาณเม็ตไขมันน้อยมาก (minimal lipid) ภายในเซลล์บุผิวของท่อตับและตับอ่อนพบ inclusion bodies ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน 2 แบบ คือ แบบแรกเป็น inclusion body ย้อมติดสีม่วงของ H&E ที่พบอยู่ภายในไซโทพลาสซึม (basophilic cytoplasmic inclusion body) (ภาพที่ 5) และแบบที่ 2 มีลักษณะแบบ Cowdry type A คือ จะมีช่องว่างใสโดยรอบ inclusion ซึ่งอยู่ภายในนิวเคลียส (intranuclear inclusion) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 ลักษณะพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน (hp) ของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยพบ basophilic cytoplasmic inclusion bodies (In) จำนวนมากแทรกตัวอยู่ในเซลล์ (H&E; bar = 50 μm)



ภาพที่ 6 ภาพขยายลักษณะของ inclusion bodies แบบ Cowdry type A (ครีซี) จำนวนมาก ที่พบภายในตับและตับอ่อนของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วย (H&E; bar = 50 μm)

จากการวิจัยในครั้งนี้โรคทางชาวสร้างความเสียหายอย่างมากกับลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักทำให้ลูกกุ้งมีอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของลูกกุ้งที่ติดเชื้อมีอาการกล้ามเนื้อสีขาวทั้งตัว โดยเฉพาะบริเวณส่วนหางเช่นเดียวกับรายงานของ Sahul Hameed et al. (2004) ซึ่งจากการศึกษาของ Qian et al. (2003) พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ Macrobrachium rosenbergii Nodavirus (MrNV) ซึ่งมีรูปร่างแบบ icosahedral ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) เป็น single strand RNA (ssRNA) ไวรัสมีขนาด 26-27 นาโนเมตร และชนิดที่สองคือ Extra small virus (XSV) มีขนาด 14-16 นาโนเมตร แต่ความสัมพันธ์ของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ต่อมา Bonami et al. (2005) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไวรัสทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวและพบว่าในกลุ่มที่มีไวรัสชนิด MrNV ในสัดส่วนที่มากกว่าชนิด XSV พบว่ากุ้งก้ามกรามจะแสดงอาการกล้ามเนื้อสีขาว แต่ในกลุ่มที่มีไวรัส MrNV ในสัดส่วนที่น้อยกว่า XSV พบว่ากุ้งก้ามกรามจะแสดงอาการกล้ามเนื้อสีขาวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

การตรวจวินิจฉัยโรคมีความสำคัญมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขณะที่เกิดการติดเชื้อในระยะแรกๆ วิธีการตรวจสอบวินิจฉัยโรคทางชาวนี้มีการศึกษาจำนวนมาก ได้แก่ Romestand and Bonami (2003) ได้พัฒนาปรับปรุงวิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (E-LISA) และ Sri Widada et al. (2004) ได้พัฒนาวิธี dot-blot hybridization, in situ hybridization และ RT-PCR เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ MrNV นอกจากนี้วิธี dot-blot hybridization และวิธี single-step RT-PCR ยังได้ถูกพัฒนาให้ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ XSV อีกด้วย ซึ่งวิธีการต่างๆ เหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดในพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามก่อนที่จะนำมาผสมพันธุ์วางไข่ และในลูกกุ้งวัยอ่อนก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในบ่อ การตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR พิสูจน์แล้วว่าเหมาะสมและแม่นยำที่สุดกว่าวิธีอื่นๆ (Sri Widada et al., 2004; Sahul Hameed et al., 2004) แต่วิธีการดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง และเนื่องจากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวมีรายละเอียดน้อยมาก ดังนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัยการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อโรคทางชาวในครั้งนี้จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจสอบได้อย่างได้ผล โดยตรวจสอบดูจาก inclusion bodies ทั้ง 2 ลักษณะดังที่กล่าวมาข้างต้น บริเวณเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่ชัดเจนที่สุด และเป็นลักษณะที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการติดเชื้อโรค ทางชาวในลูกกุ้งก้ามกราม

สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยในครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของลูกกุ้งก้ามกรามที่ป่วยจากการติดเชื้อโรคทางชาว ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิด MrNV และ ไวรัส XSV คือ พบอินคลูชัน บอดี้ส์จำนวนมากบริเวณเนื้อเยื่อของตับและตับอ่อน 2 ลักษณะ คือ อินคลูชัน บอดี้ส์ที่พบในนิวเคลียสของกลุ่มเซลล์ที่ตายแล้ว ย้อมติดสีชมพู (acidophilic intranuclear inclusion) หรือมีลักษณะแบบ Cowdry type A และอินคลูชัน บอดี้ส์ที่เกิดขึ้นในส่วนของไซโตพลาสซึมซึ่งย้อมติดสีน้ำเงิน (basophilic cytoplasmic inclusion) ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อที่ชัดเจนที่สุด และมีความแตกต่างจากการติดเชื้อของไวรัสชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบการตายของเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle necrosis) บริเวณมัดกล้ามเนื้อที่ ส่วนหลัง ส่วนท้อง และส่วนหาง ดังนั้น จึงสามารถนำลักษณะของ inclusion bodies ที่บริเวณตับและตับอ่อนมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยหรือเป็นตัวบ่งชี้ถึงการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากไวรัสชนิด MrNV และ ไวรัส XSV ในลูกกุ้งก้ามกรามที่ติดเชื้อโรคทางชาวได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคนี้เป็นลำดับต่อไป



กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเกษตรกรผู้ทำฟาร์มเพาะฟักลูกกุ้งก้ามกราม ในอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามเพื่อประกอบการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ธีรพันธุ์ ภูคาสุวรรณ. 2523. บทบรรณาธิการกุ้งก้ามกราม. **วารสารการประมง** 33 (5): 511-518.
- โสภา อาริรัตน์ และ สมเกียรติ กาญจนาคกร. 2531. ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคในกุ้งก้ามกรามกับคุณสมบัติของน้ำในบ่ออนุบาล. **เอกสารวิชาการ** ฉบับที่ 77/ 2531. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรุงเทพฯ. 12 น.
- Arcier, J.M., F. Herman, D.V. Lightner, R.M. Redman, J. Mari and J.R. Bonami. 1999. Aviral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Dis. Aquat. Org.** 38: 177-181.
- Bell, T.A. and D.V. Lightner. 1988. **A Hand Book of Normal Penaeid Shrimp Histology**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Bonami, J.R., Z Shi, D. Qian and J. Sri Widada. 2005. White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virons and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. **J. Fish Dis.** 28: 23-31.
- Qian, D., Z. Shi, S. Zhang, Z. Cao, W. Liu, L. Li, Y.xie, I. Cambournac and J.R. Bonami. 2003. Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Fish Dis.** 26: 521-527.
- Romestand, B. and J.R. Bonami. (2003). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Fish Dis.** 26: 71-75.
- Sahul Hameed, A.S., K. Yokanandhan, J. Sri Widada and J.R. Bonami. 2004. Studies on the occurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus like-particles (XSV) associated with white tail disease (WTD) of *Macrobrachium rosenbergii* in India by. **Aquaculture** 238: 127-133.
- Salin, K.R. and Nair C.M. 2003. Emerging diseases of giant freshwater prawn in India: a potential threat to sustainability. p. 57. In **Book of Abstracts, Freshwater Prawns 2003, International Symposium on Freshwater Prawn**, 20-30 August; 2003, Kochi, India, Kerala Agriculture University, Thrissur, India.
- Sri Widada, J., V. Richard, I. Cambournac, Z. Shi, D. Qian and J.R. Bonami. (2004). Dot-blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV) associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Dis. Aquat. Org.** 58: 83-87.
- Tung, C.W., C.S. Wang. And S.N. Chen. 1999. Histological and electron microscopic study on *Macrobrachium rosenbergii* muscle virus (MMV) infection in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), culture in Taiwan. **J. Fish Dis.** 22: 319-323.
- Yoganandhan, K., J. Sri Widada, J.R. Bonami and A.S. Sahul Hameed. 2005. Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. **J. Fish Dis.** 28: 65-69.

