

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย

จากการรวบรวมปูในวงศ์ Grapsidae ทั้งหมดได้ 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Varuna literata* , *Sesarma mederi* , *Sesarma polita* , *Sesarma moeschii* และ *Sesarma bocourti* จากบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ณ อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ โดยสภาพทั่วไปบริเวณบ่อเลี้ยงกุ้งเป็นสภาพป่าธรรมชาติ สามารถพบปูอาศัยอยู่แพร่พันธุ์ได้ตามธรรมชาติ จากการสำรวจได้พบปูชนิด *Sesarma moeschii* และ *Sesarma bocourti* อยู่รวมกลุ่มกันเป็นจำนวนมาก ส่วนปูชนิด *Sesarma mederi* และ *Sesarma polita* พบจำนวนน้อย และสำหรับปูชนิด *Varuna literata* ค่อนข้างหาได้ยากและพบจำนวนน้อยมาก จึงเป็นสาเหตุให้การทดลองในช่วงหลังซึ่งเป็นการยืนยันผลโดย RT – PCR ไม่สามารถเก็บรวบรวมมาทำการทดลองได้

จากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากปูทั้ง 5 ชนิด ชนิดละ 10 ตัว จากการจับจากธรรมชาติ การฉีดเหนี่ยวนำไปติดเชื้อด้วยไวรัสหัวเหลืองเป็นเวลา 3 วัน และจากการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง เป็นเวลา 3 วัน นำไปตรวจสอบด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ V3 – 2 B , Y18 – 2D และ Y 19 ซึ่งจำเพาะต่อโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสขนาด 135 , 67 และ 22 กิโลดาลตัน ไม่พบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองเป็นตะกอนจากปฏิกิริยาแอนติเจนจับกับแอนติบอดีเป็นสีน้ำตาลตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ อันได้แก่ หัวใจ กล้ามเนื้อ เหงือก ตับและตับอ่อน อวัยวะน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด รังไข่ และ อัณฑะ ซึ่งแตกต่างจากการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ได้ทำการทดลองฉีดไวรัสหัวเหลืองควบคู่กันเพื่อนำมาเป็นตัวควบคุมผลบวก โดยพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองจากการตรวจด้วยแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด และพบว่าผลของแอนติบอดีชนิด Y19 นั้นมีความเข้มชัดเจนนมากที่สุด และเข้มน้อยลงไปใน การตรวจสอบด้วย Y18 – 2D และ V3 -2B ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกุล และคณะ (2546) จากการทดสอบความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae 5 ชนิด และตรวจเชื้อโดยวิธี immunocytohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดนี้ เช่นเดียวกัน พบว่าให้ผลบวกชัดเจนเมื่อใช้แอนติบอดีต่อโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสขนาด 67 และ 22 กิโลดาลตัน นั่นคือ โมโนโคลนอลชนิด Y18 – 2D และ Y19 และให้ผลเป็นลบในแอนติบอดี V3 - 2B ที่จำเพาะต่อโปรตีนขนาด 135 กิโลดาลตัน ดังนั้น จากการทดลองจึงสรุปได้

ว่า ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง สามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิด Y19 และ Y18-2D มาตรวจสอบในวิธี immunohistochemistry ได้

และการศึกษาของ Kidchakan Supamataya และคณะ (1998) พบว่าวิธีการฉีดไวรัสเข้าสู่ตัวปูให้ผลกระทบที่มากกว่าการกินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อ หรือการจุ่มแช่ในน้ำที่มีเชื้อไวรัสปนเปื้อนในการทดลองการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวไปยังสัตว์ในกลุ่มครัสตาเซีย 3 ชนิด ได้แก่ ปูม้า *Portunus pelegicus* ปูทะเล *Scylla serrata* และเคย *Acetes sp.* ประกอบกับรายงานการศึกษาของ ยัยนั๊บ แวะและ (2545) พบการฉีดไวรัสหัวเหลืองในกุ้งวงศ์ Palaemonidae และ Penaeidae มีการติดเชื้อไวรัสมากกว่าการให้ได้รับเชื้อโดยวิธีการให้กินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อ เพราะกุ้งได้รับเชื้อไวรัสโดยตรงแน่นอน สืบเนื่องจากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้การวิจัยนี้ในระยะต่อมามุ่งเน้นที่จะศึกษาการติดเชื้อในปูด้วยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองมากกว่าการกินเนื้อกุ้งที่ติดเชื้อหัวเหลือง และจากการเฝ้าติดตามพฤติกรรมกรรมการกินอาหารของปูที่เลี้ยงด้วยเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ พบว่าปูทดลองส่วนใหญ่ไม่ค่อยกินอาหารจึงยากต่อการที่จะรับเชื้อเข้าไป ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ดังนั้น ในการศึกษาจึงลดจำนวนปูที่นำมาทดสอบการติดเชื้อโดยการกิน และไม่นำมาร่วมทดสอบยืนยันผลในวิธี RT-PCR โดยจากการตรวจสอบยืนยันผลด้วย RT – PCR ในปูที่จับจากธรรมชาติและจากการฉีดด้วยไวรัสหัวเหลืองรวม 4 ชนิดนั้น ให้ผลเป็นลบจากการตรวจสอบ

จากการวิจัยครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่า ปู ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Varuna literata* , *Sesarma mederi* , *Sesarma polita* , *Sesarma moeschii* และ *Sesarma bocourti* ไม่มีแนวโน้มในการเป็นพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลือง เนื่องจากให้ผลลบจากการตรวจสอบวิธี immunohistochemistry และยิ่งไปกว่านั้น ได้ให้ผลลบจากการพิสูจน์ยืนยันผลการตรวจสอบด้วย RT – PCR เช่นกัน ซึ่งโดยเฉพาะวิธี RT – PCR นั้น มีความไวในการตรวจสอบสูง สามารถตรวจพบปริมาณ RNA ไวรัสหัวเหลืองได้ในปริมาณเพียงแค่ว่า 0.001 พิโคกรัม (Chainarong Wongteeresupaya et al.,1997) ดังนั้นทำให้เชื่อมั่นได้ว่า ปู 5 ชนิดดังกล่าวนี้ ไม่สามารถรับเชื้อไวรัสหัวเหลืองและนำไปถ่ายทอดต่อไปยังกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงได้ ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากปูอาจมีระบบกลไกการทำลายเชื้อไวรัสหัวเหลืองก่อนที่จะเข้าสู่ตัวเซลล์ หรือ receptor site บนผิวเซลล์ในอวัยวะของปูไม่จำเพาะต่อ ligand ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไวรัสใช้เกาะและเข้าสู่ตัวเซลล์ หรือสาเหตุอื่น ๆ จึงเป็นสิ่งที่ต้องทำการศึกษาต่อไป

แต่อย่างไรก็ตาม รัชณี กลิ่นพุ่มซ้อน (2545) รายงานผลศึกษาพบปู 4 ชนิดคือ ปูม้า, ปูทะเล, ปูแสม และปูก้ามดาบ สามารถเป็นพาหะของโรคไวรัสหัวเหลืองจากการทดลองฉีดเชื้อ

ไวรัสหัวเหลืองในปูและนำไปเลี้ยงร่วมกับกุ้งกุลาดำ โดยติดตามผลการติดเชื้อในกุ้งและปูทุก ๆ 12 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี one-step nested RT-PCR ซึ่งจากการสังเกตแถบผลผลิต PCR แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองที่ขนาด 136 และ 188 คู่เบสนั้น เกิดขึ้นในลักษณะไม่คงที่เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งในความเป็นจริง ลักษณะแถบผลผลิต PCR ควรพบอย่างต่อเนื่องเริ่มตั้งแต่เมื่อสัตว์ทดลองมีการติดเชื้อไวรัส ดังผลการศึกษาของ Chainarong Wongteerasupaya และคณะ (1997) พบแถบผลผลิต PCR ต่อเนื่องกันโดยตลอดเมื่อพบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ ตรวจโดยวิธี RT-PCR เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 – 18 ซึ่งสาเหตุของการเกิดแถบ PCR ที่ไม่คงที่อาจเนื่องจากวิธี one – step nested RT-PCR นั้นมีความไวสูงมากแม้แต่ในสิ่งรบกวน เช่นน้ำที่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสหัวเหลืองปริมาณเล็กน้อยสามารถทำให้เกิดแถบ PCR ปรากฏขึ้นได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่แถบ PCR แสดงการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูชนิดต่าง ๆ นั้นเกิดขึ้นจากสิ่งรบกวน นอกจากนี้ Anil , Shankar และ Mohan (2000 cited in Lo et al. and Tsai et al., 1998,1999) กล่าวถึงความไวของวิธี PCR ต่อการระบาดของเชื้อไวรัส โดยถึงแม้ว่าตรวจพบสัตว์ทดลองในบ่อกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวด้วย 2-step PCR (nested PCR) ซึ่งมีความไวสูงมากนั้นเกิดเป็นผลบวก ก็อาจไม่ใช่สาเหตุของการระบาดของโรค และอีกทั้งยังมีความจำกัดในการแพร่กระจายโรคในบ่อเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามถ้าตรวจพบเป็นผลบวกในขั้น 1 – step PCR ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากกว่านั้น น่าจะนำมาพิจารณาให้เป็นพาหะที่ก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้มากกว่า

และนอกจากนี้ จากข้อสังเกตการรายงานของ Lo และคณะ (1996) พบเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวสามารถถ่ายทอดไปยังกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย 2-step PCR และพบการเกิดอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสด้วยเช่นกัน แต่ในขณะที่ Hameed , Charles และ Anilkumar (2000) ศึกษาการรับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งน้ำจืด 3 ชนิด คือ *Macrobrachium idella* , *M. lamerrae* และ *M. rosenbergii* จากการฉีด การกิน และการจุ่มแช่ไวรัสตัวแดงดวงขาว พบว่า *Macrobrachium rosenbergii* เท่านั้นที่ไม่พบอาการของโรคจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวตลอดระยะเวลาการทดลอง และเมื่อตรวจด้วยวิธี Western blot และ histopathology ก็ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการตรวจสอบโรคซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการเป็นฐานข้อมูลของการวิจัยต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ ทำให้ทราบถึงปูในวงศ์ Grapsidae 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ *Varuna literata* , *Sesarma mederi* , *Sesarma polita* , *Sesarma moeschii* และ *Sesarma bocourti* นั้น ไม่มีแนวโน้มในการเป็นพาหะของไวรัสหัวเหลือง จากข้อมูลดังกล่าวนี้ สามารถนำไปเผยแพร่เพื่อเป็นประโยชน์สำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งทั่วไป รวมทั้งนักวิจัยรุ่นหลังในการดำเนินผลงานที่เกี่ยวข้องสืบเนื่องต่อไปได้

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดลองการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีการฉีดและกิน เนื้อกุ้งที่ติดไวรัสหัวเหลืองเป็นระยะเวลา 3 วัน ซึ่งอาจเพิ่มขอบเขตการทดลองโดยทำการเพิ่มจำนวนวันในการเลี้ยงมากขึ้น เพื่อขยายการสังเกตผลการติดเชื้อในปูให้แน่ชัดมากขึ้น ซึ่งอาจมีความเกี่ยวเนื่องกับระยะเวลาของการเพิ่มจำนวนไวรัสก็เป็นได้ และ สำหรับปูชนิด *Varuna literata* ควรทำการสำรวจจากบริเวณอื่น ๆ ซึ่งอาจเป็นแหล่งอาศัยที่สำคัญของปูชนิดนี้ เพื่อทำการรวบรวมนำมายืนยันผลด้วย RT - PCR ให้เป็นหลักฐานชัดเจนในการไม่เป็นพาหะของโรคหัวเหลือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย