บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทยนั้นมีมายาวนานกว่า 50 ปีแล้ว เนื่องจากกุ้งทะเลเป็นสินค้าที่ตลาดโลกมีความต้องการสูงเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ ปริมาณการจับกุ้งจากทะเลนับวันจะลดจำนวนลง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจึงเพิ่มบทบาทความสำคัญมากยิ่งขึ้น โดยประเทศไทยนับเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสูงมาก โดยเป็นหนึ่งในไม่กี่ประเทศที่สามารถเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลโดยเฉพาะอย่างยิ่ง กุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp : *Penaeus monodon*) เนื่องจากเหตุผลหลายประการด้วยกัน คือ ประเทศไทยมีบริเวณชายฝั่งทะเลและป่าชายเลนที่อุดมสมบูรณ์เหมาะสมเป็นจำนวนมาก มีสภาพอากาศอบอุ่นตลอดปีเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง มีกุ้งชนิดที่โตเร็วให้ผลผลิตสูง คือ มีกุ้งขนาดใหญ่ โตเร็ว รสชาติดี เหมาะสมต่อการนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง มีวัตถุดิบที่จะใช้ทำอาหารกุ้งมากเพียงพอและมีราคาถูก แรงงานหาง่าย ชำนาญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้น ในปัจจุบัน กุ้งกุลาดำจึงถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยในทศวรรษที่ 1990 ประเทศไทยสามารถส่งออกสินค้ากุ้งกุลาดำ เป็นรายใหญ่ของโลก มีส่วนแบ่งการตลาดอยู่ประมาณ 1 ใน 4 ของตลาดโลก ซึ่งผลผลิตกว่าร้อยละ 99 นั้นเป็นผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงในฟาร์มทั้งสิ้น (พายัพ ยังปักษี, บรรณาธิการ, 2544: 1-2;วารสารอาหาร, 2541: 5)

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในอดีต มีการเลี้ยงแบบดั้งเดิมหรือแบบธรรมชาติ (Extensive) เป็นวิธีการเลี้ยงที่ปล่อยให้เป็นไปตามธรรมชาติโดยไม่มีการจัดการใดๆในฟาร์ม และอีกแบบคือแบบกึ่งพัฒนา (Semi-intensive) มีการปล่อยกุ้งเสริมจากโรงเพาะฟักและให้อาหารสมทบ แต่ไม่มีการจัดการในเรื่องอากาศและสารเคมีในการเลี้ยง การเลี้ยงกุ้งทั้งสองแบบนี้ จึงทำให้ได้ผลผลิตที่ยังคงต่ำอยู่เมื่อเทียบกับพื้นที่การเพาะเลี้ยง มาถึงปัจจุบัน มีการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา (Intensive) ซึ่งได้นำหลักวิชาการเข้ามาช่วยอย่างมาก มีการจัดการบ่อที่มีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดการขยายตัวอย่างรวดเร็วตั้งแต่ปี 2530 เป็นต้นมา มีผลตอบแทนสูง ทำให้การทำนากุ้งเป็นที่นิยมแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน

อย่างไรก็ตาม ธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งในปัจจุบันก็ยังประสบกับปัญหาจากการที่ผู้ประกอบการไม่มีข้อมูลในการเลี้ยงเพียงพอ ขาดการวางแผนที่ถูกต้องและขาดหลักวิชาการใน

การดำเนินงาน ทำให้เกิดมลภาวะเป็นพิษและทำลายสิ่งแวดล้อม จนกระทั่งเคยส่งผลให้ตลาดต่างประเทศกีดกันการรับซื้อกุ้งจากประเทศไทย ด้วยมาตรการ code of product (พายัพ ยังปักษี, บรรณาธิการ, 2544: 3 - 8) นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนานั้น แท้จริง มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ซึ่งเป็นการเลี้ยงที่หนาแน่น และปัญหาที่ตามมา ก็คือกุ้งมีความเครียดง่ายต่อการเป็นโรค ซึ่งส่วนมากสาเหตุการเกิดโรคกุ้งนั้นเกิดจากสภาพก้นบ่อและสภาพน้ำที่ไม่ดี ทำให้กุ้งมีภูมิต้านทานต่อโรคต่ำลง เมื่อมีเชื้อโรคปนมากับน้ำหรืออยู่ที่ก้นบ่อ กุ้งก็จะติดโรคได้ง่าย วิธีที่ดีที่สุดและเป็นการป้องกันร่วมกัน คือการรักษาคุณภาพน้ำและก้นบ่อให้ดีที่สุด ระบายของเสียหรือน้ำเสียอันเป็นบ่อเกิดโรคออกไปนอกบ่อ ซึ่งช่วยให้กุ้งลอกคราบเพื่อสลัดเอาโรคที่ติดมากับเปลือกและเหงือกออกไปด้วย ถ้าวิธีนี้ยังไม่ทำให้กุ้งหายจากอาการโรคจึงจำเป็นที่จะต้องให้ยารักษา (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2532: 117) แต่อย่างไรก็ตาม ขณะนี้โรคกุ้งบางชนิดที่เกิดจากไวรัสก็ยังไม่มียาใดรักษาได้

หนึ่งในจำนวนโรคเหล่านั้น คือ โรคหัวเหลือง ซึ่งเป็นโรคที่เรียกตามกลุ่มอาการที่มีลักษณะกุ้งเป็นโรค บริเวณหัวหรือตับและตับอ่อนมีสีเหลืองเกิดจากไวรัส วาย เอช วี (Yellow head virus) เป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างหนักในการเลี้ยงกุ้งของไทยตั้งแต่ปี 2533 เป็นต้นมา ซึ่งในต้นปี 2535 โรคหัวเหลืองเริ่มเข้าสู่ภาคใต้ ที่ อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช และแพร่กระจายไปตลอดแนวชายฝั่งทำเลตะวันออก คือ จังหวัด สงขลา ปัตตานี ซึ่งรวมความเสียหายจากโรคหัวเหลืองใน 3 จังหวัดภาคใต้ สูงถึงประมาณ 154 ล้านบาท เนื่องจากไวรัสนี้มีความรุนแรงทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็วและหมดบ่อภายใน 3 – 5 วัน การระบาดของโรคหัวเหลืองก็ยังพบได้อยู่ทั่วไป โดยยังไม่มีสารเคมีหรือยาชนิดไหนรักษาได้ ขณะนี้การป้องกันจึงเป็นเพียงหนทางเดียวที่จะสามารถหยุดยั้งการเกิดโรคและแพร่กระจายของโรคได้ ซึ่งทำได้โดยการจัดการบ่อเลี้ยงกุ้ง เลือกลูกกุ้งเฉพาะที่แข็งแรงในการเลี้ยง และให้อาหารที่มีคุณภาพ คุณภาพน้ำและสภาพพื้นบ่อดีมีการจัดการของเสียที่เกิดขึ้นในบ่อ และสิ่งสำคัญที่สุด คือ ป้องกันไม่ให้กุ้งชนิดต่างๆที่อยู่ในน้ำธรรมชาติหรือกุ้งกุลาดำจากบ่อที่เป็นโรคหัวเหลืองปนเข้ามาในบ่อเลี้ยง เพื่อลดโอกาสการแพร่ระบาดโดยนำเชื้อ ไวรัสจากพาหะเข้ามาสู่กุ้งที่เลี้ยง (สิทธิ บุณยรัตผลิน, 2535 :2)

แต่เนื่องจากยังไม่มีการตรวจสอบอย่างแน่ชัดว่าสัตว์ชนิดใดบ้าง ที่สามารถเป็นพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลือง ปัจจุบันจึงมีกลุ่มนักวิจัยได้ให้ความสนใจศึกษากลุ่มตัวอย่างสัตว์หลายชนิดที่มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นพาหะนำโรค โดยปูเป็นสัตว์ประเภทหนึ่งที่มีแนวโน้มในการเป็นพาหะนำโรคไวรัสสูงเนื่องจากพฤติกรรมการกินซากกุ้ง ทนทานต่อโรคและสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดี (Kidchakan Supamataya et al., 1998) นอกจากนี้ยังได้มีการพิสูจน์มาแล้วว่า ปูบางชนิด

สามารถเป็นพาหะนำโรคตัวแดงดวงขาว ซึ่งเป็นไวรัสที่มีความรุนแรงระบาดในกุ้งกุลาดำ เช่นเดียวกับไวรัสโรคหัวเหลือง (Lo et al., 1996) ซึ่งการพิสูจน์ดังกล่าว เชื่อว่า ปูบางชนิดอาจเป็นพาหะนำโรคหัวเหลืองได้เช่นเดียวกัน

การวินิจฉัยโรคหัวเหลืองในปัจจุบันทำได้โดยการสังเกตอาการกุ้งที่เลี้ยงและอาศัยผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการควบคู่กัน โดยเมื่อสังเกตอาการกุ้งที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลืองนั้นจะกินอาหารสูงผิดปกติในช่วงแรก เคลื่อนไหวช้า และเริ่มมีสีเหลืองที่บริเวณส่วนหัว และนำไปยืนยันผลด้วยวิธีการตรวจเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แต่มีข้อจำกัดคือ ใช้เวลาในการตรวจสอบหลายวันทำให้ไม่สามารถควบคุมการระบาดได้ทันท่วงที (Flegel et al, 1995) ต่อมา มีการพัฒนาการตรวจเนื้อเยื่อภายในเวลาที่สั้นมากขึ้นเพียงแค่ 4 ชั่วโมงก็ทราบผลแล้ว โดยใช้แผ่นเหงือกของกุ้งที่ป่วยเป็นโรคหัวเหลืองมาทำการตรึงด้วย Davidson's fixative และย้อมสีฮีมาทอกซิลิน-อิโอซินตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ ข้อจำกัดคือ ไม่สามารถตรวจได้ในกุ้งที่ติดเชื้อในระยะแรกโดยจะต้องเป็นกุ้งที่ป่วยแสดงอาการของโรคแล้วเท่านั้น (Flegel, 1995,cited in Flegel and Siriporn Sriurairatana,1993,1994)

ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ตรวจการติดเชื้อไวรัสทั้งในกุ้งกุลาดำพ่อแม่พันธุ์ กุ้งวัยอ่อนที่เป็นพาหะนำโรคในโรงเพาะฟัก รวมไปถึงยังสามารถนำผลไปใช้เปรียบเทียบความแตกต่างกับไวรัสอื่นๆที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีความไวสูงจำเพาะต่อโรค และให้ผลได้อย่างรวดเร็ว แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ ต้องนำมาดำเนินการในห้องปฏิบัติการ และค่าใช้จ่ายสูง (Chainarong Wongteerapaya et al.,1997) นอกจากนี้มีรายงานกล่าวถึงข้อจำกัดในการนำชิ้นส่วนRNAสายเดี่ยว ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญที่จะนำไปใช้ในเทคนิค RT-PCR โดยมีคุณสมบัติย่อยสลายโดยง่ายในสภาพที่เป็นกรดหรือด่าง และยังสลายได้โดยเอมไซม์บางชนิด จึงส่งผลทำให้การวินิจฉัยด้วยเทคนิคนี้มีความยุ่งยากต่อการควบคุมสภาวะต่างๆในแต่ละขั้นตอน (Poulos et al.,1999)

นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิค Western Blot มาใช้วินิจฉัยทั้งไวรัสหัวเหลืองและตัวแดงดวงขาว ซึ่งนำเพียงเลือดของกุ้งตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสมาตรวจโดยไม่ต้องทำให้สัตว์ทดลองตาย ผลที่ได้นั้นมีความจำเพาะสูง สามารถทราบผลการวิเคราะห์ได้ก่อนที่จะมีอาการป่วยของกุ้งที่ติดเชื้อเกิดขึ้น (Nadala et al., 1997) แต่วิธีดังกล่าวยังมีความยุ่งยากในการดำเนินการและต้องทำในห้องปฏิบัติการเฉพาะ

ต่อมามีรายงานความสำเร็จในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงต่อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งกุลาดำ สามารถที่จะนำไปพัฒนาเป็นเครื่องมือตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในกุ้งที่ติดเชื้อได้ตั้งแต่ระยะแรก จนถึงการติดเชื้อในขั้นรุนแรง (Paisarn Sitthigorngul et al., 2000) เนื่องจากแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลนั้น มีความจำเพาะต่อแอนติเจนสูงมาก ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการนำไปพัฒนาเป็นวิธีการตรวจรุ่นใหม่ที่มีความไว และจำเพาะมากกว่าเดิม รวมถึงมีศักยภาพสูงที่จะนำไปใช้รักษาโรค อีกทั้งยังสามารถผลิตได้ในปริมาณมากตามต้องการ (สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, 2537)

ในงานวิจัยจึงได้เลือกนำโมโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองนี้ มาเป็นเครื่องมือตรวจสอบการติดเชื้อในปูบางชนิด ที่คาดว่าอาจเป็นพาหะนำโรค ร่วมกับวิธีทาง immunohistochemistry ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ ช่วยลดความยุ่งยากในการปฏิบัติ ประกอบกับค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่าวิธีอื่นๆ และสุดท้ายยืนยันผลที่ได้โดยใช้วิธี one step RT-PCR

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พิสูจน์ตัวอย่างปูแต่ละชนิดในการเป็นพาหะนำโรคไวรัสหัวเหลือง

2.ศึกษาและวิเคราะห์ผลการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อปูแต่ละชนิดที่จับจากธรรมชาติ, จากการทดลองเหนี่ยวนำการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธีการฉีด และกินเนื้อกุ้งกุลาดำที่มีเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดยตรวจสอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสหัวเหลือง

3.ศึกษาวิเคราะห์ และทำการยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในเนื้อเยื่อปูหลังจากการทดลองเหนี่ยวนำการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองด้วยวิธีการฉีดโดยใช้วิธี one step RT – PCR

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.สำรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติของปูชนิดต่างๆ ตามแหล่งเพาะกุ้งกุลาดำ โดยจำนวนปูแต่ละชนิด 10 ตัว

2. ทดลองการติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูชนิดต่างๆ โดยจำนวนปูในแต่ละชนิด 10 ตัว

3. ทดลองการติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูชนิดต่างๆ โดยจำนวนปูแต่ละชนิด 5 - 10 ตัว

4. ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองตามธรรมชาติ การติดเชื้อโดยการฉีดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และการติดเชื้อโดยการให้กินเนื้อกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองของปูชนิดต่างๆ โดยวิธี immonohistochemistry

5. ยืนยันผลการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูที่เหนี่ยวนำการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธีการฉีด โดยใช้วิธี one step RT-PCR ในการตรวจสอบ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.ทราบแนวโน้มการเป็นแหล่งสะสมของเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูแต่ละชนิดซึ่งเป็นสาเหตุในการระบาดของเชื้อไวรัสตามธรรมชาติ

2.ทราบความสามารถในการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองในปูชนิดต่างๆโดยการทดลองการเหนี่ยวนำการติดเชื้อไวรัสด้วยการฉีดไวรัสหัวเหลือง, การกินเนื้อเยื่อกุ้งกุลาดำที่มีเชื้อไวรัสหัวเหลือง

3.ทราบถึงประสิทธิภาพการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสหัวเหลืองในการตรวจการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งจะนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิทยาศาสตร์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย