บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การทดสอบประสิทธิภาพของ florfenicol ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ โดยวิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios ในห้องปฏิบัติการ (Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) พบว่าความเข้มข้นของ florfenicol และ chloramphenicol ที่สามารถยับยั้งเชื้อ vibrios ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเค็ม 0‰ มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.5-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MICs เมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเค็ม 5‰ อยู่ในช่วง 0.5-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าช่วงความเข้มข้นของ chloramphenicol ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios (MICs range) มีค่ากว้างกว่าช่วงความเข้มข้นของ florfenicol ซึ่งอาจเนื่องมาจาก chloramphenicol เป็นยาที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในแถบประเทศประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แม้ว่าจะเป็นยาต้านจุลชีพที่ห้ามใช้ในสัตว์ที่เป็นอาหารก็ตาม (Gräslund *et.al.*, 2002) การใช้ chloramphenicol ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของไทยอาจทำให้เชื้อ vibrios มีความไวรับต่อ chloramphenicol น้อยกว่า florfenicol ซึ่งเป็นยาที่ยังไม่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล ค่า MICs จากการศึกษานี้อยู่ในช่วงเดียวกับการศึกษาของ Mohney และคณะ (1992) ซึ่งทำการเปรียบเทียบความไวรับของเชื้อ vibrios ต่อยาต้านจุลชีพ 12 ชนิด คือ chloramphenicol, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, oxytetracycline, paromomycin, Romet®, Sarafin® และยาในกลุ่ม fluoroquinolines อีก 4 ชนิด ที่ไม่ได้ระบุชนิดของยา (PD124816, PD127391, PD131628 และ PD132133) โดยทดสอบกับเชื้อ vibiros จำนวน 9 isolates ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำป่วยจาก ฮาวาย เท็กซัส อริโซนา เอกวาดอร์ ญี่ปุ่น และไทย ค่า MICs ของ florfenicol เท่ากับ 0.5-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผู้วิจัยให้ข้อคิดเห็นว่า florfenicol เป็นยาต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า chloramphenicol ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios ที่ทดสอบ ผลการศึกษาของ Fukui และคณะ (1987) รายงานผลการทดสอบความไวรับของเชื้อ *V. anguillarum* ที่แยกจากปลาทองป่วยต่อยาต้านจุลชีพ 3 ชนิด คือ chloramphenicol, thiamphenicol และ florfenicol ได้ค่า MICs เท่ากับ 0.4-0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าผลการทดสอบกับเชื้อ vibrios ของการศึกษานี้และการศึกษาของ Mohney และคณะ (1992)

Ho และคณะ (2000) ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ chloramphenicol thiamphenicol และ florfenicol กับยาปฏิชีวนะอีก 3 ชนิด คือ amoxicillin oxytetracycline และ oxolinic acid ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตะพาบน้ำ ปลา และกุ้งปูในประเทศไต้หวัน พบค่า MICs ของ florfenicol และ chloramphenicol เมื่อทดสอบกับ *Vibrio* spp. ที่แยกจากสัตว์ต่างๆดังกล่าว เท่ากับ 0.78-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.78-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบต่อ florfenicol เท่ากับ 20% ของจำนวนเชื้อที่ทดสอบและการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียต่อ chloramphenicol เท่ากับ 27% ของจำนวนเชื้อที่ทดสอบ โดยพิจารณาค่า MICs ที่มากกว่า 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระดับของการดื้อยา ซึ่งผู้วิจัยสรุปว่ายาที่มีช่วง MICs กว้าง แสดงถึงโอกาสเกิดการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียต่อยาชนิดนั้น ซึ่งสัมพันธ์กับการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดนั้นเป็นระยะเวลานาน อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้อ้างอิงระดับความไวรับของเชื้อ vibrios ต่อ chloramphenicol โดยพิจารณาจากฐานข้อมูลของ National Committee of Clinical Laboratory Standard (NCCLS) ที่กำหนดความไวรับของเชื้อ *Vibrio chelerae* ต่อ chloramphenicol ที่ ≤ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการศึกษานี้จึงไม่พบการดื้อยาของเชื้อ vibrios ที่ทำการทดสอบ

การศึกษาผลของน้ำทะเลต่อประสิทธิภาพของ florfenicol และ chloramphenicol ในการยับยั้งเชื้อ vibiros ที่ระดับความเค็ม 5‰ ซึ่งเป็นระดับความเค็มที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโตเต็มวัย พบว่าช่วง MICs ของ florfenicol มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.5-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 0.5-4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนช่วง MICs ของ chloramphenicol ไม่เปลี่ยนแปลง ผลของน้ำทะเลต่อการลดประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพรายงานโดย Torkildsen และคณะ (2000) ซึ่งทดสอบค่า MICs ของยาต้านจุลชีพ (chloramphenicol, florfenicol, fluemequine และ trimethoprim/sulfadiazine) ต่อเชื้อ *Vibrio* spp. และ *Aeromonas* spp. ที่แยกจากหอย scallop โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบค่า MICs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำกลั่นกับการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำทะเลความเค็ม 25‰ ผลการศึกษาพบว่าน้ำทะเลที่ระดับความเค็มดังกล่าวไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของ florfenicol และ chloramphenicol แต่มีผลต่อ trimethoprim/sulfadiazine และ flumequine โดยทำให้มีค่า MICs ของยาเหล่านี้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้วิจัยอธิบายว่าน้ำทะเลมีผลทำให้การออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของยาบางชนิดลดลงเนื่องจากน้ำทะเลมีแร่ธาตุต่างๆ เป็นส่วนประกอบมากมาย เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งมีประจุบวกเป็นหลัก มีผลต่อสรีรวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย หรือส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือมีผลต่อยาหรือสารเคมีโดยตรง ซึ่งทำให้ความไวรับของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพและค่า MICs เปลี่ยนแปลงไป

การออกฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพมีความเกี่ยวข้องกับ permeability ของ cell envelope โดยการลด permeability ของเซลล์ ทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดความต้านทานต่อยา และการเพิ่ม permeability ของเซลล์ทำให้เชื้อแบคทีเรียเกิดความไวรับต่อยา ส่วนประกอบในน้ำทะเลมีอิทธิพลต่อสรีรวิทยาของเซลล์แบคทีเรีย โดยปกตินำ้ทะเลที่ความเค็ม 35‰ ประกอบด้วย 54 mMMg^{2+} และ 10 mMCa^{2+} ซึ่ง divalent cation นี้มีส่วนอย่างมากต่อการลดประสิทธิภาพของยาต้านจุลชีพ โดยโมเลกุลซึ่งมีประจุลบของ lipopolysaccharide layer (LPS) ซึ่งเป็นส่วน outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบจะถูก neutralised โดยประจุบวกจากน้ำทะเล ทำให้เซลล์ลด permeability ต่อยาต้านจุลชีพซึ่งเป็นโมเลกุลประจุบวก (Lunestad and Samuelsen, 2001)

การศึกษานี้ทดสอบการกระจายของ florfenicol ในเนื้อเยื่อ hepatopancreas และกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำหลังจากให้อาหารผสมยา โดยให้ florfenicol ในขนาด 0.8 กรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร และให้อาหารปริมาณ 2.5% ของน้ำหนักตัวต่อวัน (ภาคผนวก 2) เฉลี่ยให้อาหารตลอดวัน วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลาติดต่อกัน 5 วัน แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณ florfenicol-amine (FFA) ซึ่งเป็นสารเมตาบอไลท์สำคัญของ florfenicol ในเนื้อเยื่อ hepatopancreas และกล้ามเนื้อ ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเฉลี่ยของ FFA แสดงว่าการให้ยาในลักษณะดังกล่าวเป็นวิธีปฏิบัติที่สามารถทำให้ระดับของยาในเนื้อเยื่อ มีปริมาณที่สม่ำเสมอตลอดระยะเวลาของการให้ยา โดย FFA จะมีปริมาณสูงใน hepatopancreas (FFA เฉลี่ย 0.5-0.6 ไมโครกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อ) และปริมาณต่ำกว่าในกล้ามเนื้อ (FFA เฉลี่ย 0.1-0.15 ไมโครกรัมต่อกรัมกล้ามเนื้อ) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ florfenicol ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ vibiros จากการทดสอบ MIC_{50} เท่ากับ 1 µg/ml (ตารางที่ 14) ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของ FFA ที่พบใน hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำ จึงอาจแสดงว่าการผสมยาในอาหารด้วยขนาด 0.8 กรัม florfenicol ต่อกิโลกรัมอาหาร ยังไม่เหมาะสมที่จะทำให้ปริมาณ florfenicol ใน hepatopancreas สูงกว่าหรือเท่ากับระดับ MIC_{50} ของ florfenicol ในการยับยั้งเชื้อ vibiros รายงานการศึกษาในปลาคอดโดย Stamm (1989) พบว่าระดับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพ (oxolinic acid และ florfenicol) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในร่างกายควรเป็น 3-4 เท่าของค่า MICs ที่ได้จากการทดสอบกับเชื้อชนิดเดียวกันทางห้องปฏิบัติการ (Stamm, 1989 อ้างถึงโดย Samuelsen *et al.*, 2003)

การให้ florfenicol แก่กุ้งกุลาดำ โดยวิธีการผสมยาในอาหารพบว่าความเข้มข้นของยาสูงสุด (C_{max}) ที่ hepatopancreas ที่เวลา (T_{max}) ประมาณ 1 ชั่วโมง และในกล้ามเนื้อที่เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง ภายหลังจากได้รับยาครั้งแรก เทียบกับการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของ Yanong และ Curtis (2005) ซึ่งทำการศึกษาใน Koi carp โดยให้อาหารผสม florfenicol ในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว และเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา ให้อาหารปริมาณ 1% ของน้ำหนักตัวต่อวัน พบ C_{max} ใน

พลาสม่าเท่ากับ 12.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา T_{max} 3 ชั่วโมง ในขณะที่ Samuelsen และคณะ (2003) ทำการศึกษาในปลาคอด โดยให้ florfenicol ผสมในอาหาร ในขนาด 10 มิลลิกรัมยาต่อน้ำหนักตัวปลา ให้กินอาหาร 1 กรัมอาหารต่อน้ำหนักตัว โดยการสอดท่อซิลิโคนเข้าทางเดินอาหาร พบค่า C_{max} ในพลาสม่าเท่ากับ 10.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา T_{max} 7 ชั่วโมง และ C_{max} ในกล้ามเนื้อเท่ากับ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา T_{max} 9 ชั่วโมง การศึกษาในปลาแซลมอน โดยให้ florfenicol ในขนาดเดียวกัน คือ 10 มิลลิกรัมยาต่อน้ำหนักตัวปลาป้อนเข้าปาก พบค่า C_{max} ใน พลาสม่าเท่ากับ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา T_{max} 10.3 ชั่วโมง (Martinsen *et al.*, 1993) ซึ่งความแตกต่างของเวลาและปริมาณความเข้มข้นสูงสุดของยาที่ตรวจพบขึ้นกับชนิดสัตว์ทดลอง วิธีการให้ยาแก่สัตว์ทดลอง และปัจจัยที่สำคัญ คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง โดยในการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิประมาณ 27-30 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกับ Yanong และ Curtis (2005) ซึ่งทำการศึกษาที่ 23-25 อาศาเซลเซียส ในขณะที่ Samuelsen และคณะ (2003) อธิบายผลการศึกษาว่าปลาคอดที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่ำ มีอัตราการกระจายยาและสาร เมตาบอไลท์ในร่างกายลดลง ดังนั้นเวลาที่ปริมาณยาสูงสุด (T_{max}) ในร่างกายจะนานกว่าปลาคอดที่เลี้ยงในอุณหภูมิที่สูงกว่า นอกจากนี้สัตว์น้ำแต่ละชนิดมีอัตราเมตาบอไลท์ในร่างกายต่างกัน

ปริมาณ FFA เฉลี่ยที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อตลอดระยะเวลาที่กุ้งได้รับยาจากการศึกษานี้คิดเป็นประมาณ 0.25-3.5% ของปริมาณยาที่ผสมในอาหาร Yanong และ Curtis (2005) รายงานปริมาณ florfenicol ที่ตรวจพบในพลาสม่าของปลาเก๋าและปลา Koi carp คิดเป็น 13% และ 29% ของปริมาณ florfenicol ที่ปลาเก๋าและปลา Koi carp ได้รับตามลำดับ ซึ่งการศึกษาทั้งสองดังกล่าวเป็นการให้ปลากินอาหารที่ผสมยาและอาหารมีการสัมผัสกับน้ำในระหว่างการให้อาหาร ต่างจากการศึกษาอื่นซึ่งเป็นการให้ florfenicol แก่ปลา โดยอาหารที่ผสม florfenicol (medicated diet) เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารโดยตรง (สอดท่ออาหาร) ไม่ผ่านการสัมผัสกับน้ำ จึงทำให้ปริมาณ FFA ที่ตรวจพบในพลาสม่าสูงถึง 91% (Samuelsen *et. al.*, 2003) และ 96.5% (Martinsen *et. al.*, 1993)

การตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของ FFA ที่ตกค้างใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อของกุ้งกุลาดำหลังจากที่ได้รับ florfenicol ในขนาด 0.8 กรัมยาต่อกิโลกรัมอาหารติดต่อกัน 5 วัน ตรวจพบสาร FFA ใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อจนถึงวันที่ 5 ของการหยุดยา แต่ตรวจไม่พบ FFA (ไม่สามารถตรวจได้หรือมีความเข้มข้นสารต่ำกว่าค่า LOD) ในวันที่ 7 ของการหยุดยา (ตารางที่ 16 และตารางที่ 17) ดังนั้นการให้ florfenicol แก่กุ้งกุลาดำขนาดดังกล่าวสามารถกำหนดระยะเวลาหยุดยาที่อย่างน้อย 7 วัน อย่างไรก็ตามการกำหนดระยะเวลาหยุดยาที่แน่ชัดควรมีการศึกษาซ้ำอีกครั้งหนึ่งด้วย

การให้ยาในอาหารด้วยขนาดที่สูงขึ้น เพื่อให้ปริมาณยาในตัวกุ้งมีระดับเหมาะสมสำหรับการยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibiros

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ FFA ในน้ำเลี้ยงในระหว่างการทดลองพบว่ามีการสูญเสียของ florfenicol จากอาหารสู่น้ำ (leaching effect) มากกว่า 50% ภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากการใส่อาหารผสมยาลงในน้ำในระบบน้ำนิ่ง แม้ว่าจะมีการใช้น้ำมันปลาหมึกเคลือบอาหารก็ตาม เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Yanong และ Curtis (2005) ที่ทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ florfenicol ใน Koi carp โดยการให้ยาทางปากด้วยการผสมยาในอาหารและเคลือบทับด้วยน้ำมันปลา พบว่ามียาละลายออกจากอาหารสู่น้ำทั้งหมดประมาณ 50-80% โดยตรวจพบ florfenicol ภายใน 5 นาทีหลังการใส่อาหารผสมยาลงตู้ทดลอง ดังนั้นการให้ยาในลักษณะเช่นนี้ควรมีการจัดการเพื่อให้กุ้งกินอาหารผสมยาได้หมดในระยะเวลาน้อยกว่า 30 นาที และอาจต้องพิจารณาถึงกระบวนการอื่นๆ ที่จะป้องกันการสูญเสียของยา เช่น การเพิ่มความถี่ในการให้อาหารแต่ลดปริมาณอาหารที่ให้ลง หรือ การผลิตยาผสมอาหารอัดเม็ด เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

สามารถนำ florfenicol ไปใช้เพื่อรักษาการติดเชื้อ vibrios ในกุ้งทะเล เนื่องจากยาชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios ทางห้องปฏิบัติการ และได้รับอนุญาตให้ใช้ในสัตว์ที่นำมาบริโภค แต่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ขนาด florfenicol ที่ให้สู่ร่างกาย แล้วสามารถคงอยู่ในเนื้อเยื่อที่ไม่ต่ำกว่าค่า MIC_{50} ที่ได้จากทางห้องปฏิบัติการ และทำการศึกษาวิธีการให้อาหารผสมยา florfenicol ในกุ้งกุลาดำซ้ำ โดยให้ยาในลักษณะเดียวกันแต่เพิ่มขนาดยาในอาหารหรือเปลี่ยนวิธีการผสมยาในอาหารเป็นลักษณะการผลิตยาผสมอาหารอัดเม็ด และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของระดับความเค็มที่ระดับความเค็มอื่นๆ ที่เกษตรกรมีการใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ ต่อประสิทธิภาพของ florfenicol ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ vibrios