ประสิทธิภาพของเอ็นโรฟลอกซาซินที่มีต่อโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ

จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์ และ อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ์
สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง ม. ๘ ต. พะวง อ. เมือง จ. สงขลา ๙๐๑๐๐

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซิน ในการป้องกันโรควิบริโอซิสในกุ้งกุลาดำ แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกทดสอบการตอบสนองของเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอที่แยกได้จากกุ้งป่วยจำนวน 32 สายพันธุ์ต่อยาเอ็นโรฟลอกซาซิน พบค่าความเข้มข้นของยาเอ็นโรฟลอกซาซินต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสกุลนี้ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-2 ส่วนในล้านส่วน สำหรับส่วนที่สอง ได้ศึกษาประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินที่มีต่อโรคติดเชื้อวิบริโอซีส โดยให้กุ้งกุลาดำน้ำหนัก 10-15 กรัม กินอาหารผสมยาเอ็นโรฟลอกซาซินในอัตราส่วน 2.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและ 3.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน จึงฉีดแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* เข้ากล้ามเนื้อในระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ทำให้กุ้งตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง (4.09×10^8 เซลล์) หลังจากฉีดเชื้อ 7 วัน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสมยาในระดับสูงจะมีอัตรารอดสูงกว่า (75%) กุ้งในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมยาในระดับต่ำ (55%) และกลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารผสมยา (35%) ซึ่งพอจะสรุปได้ว่าปัจจุบันยาเอ็นโรฟลอกซาซินมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคแบคทีเรียเรืองแสงได้ดีพอสมควร

คำสำคัญ : เอ็นโรฟลอกซาซิน, โรควิบริโอซีส, กุ้งกุลาดำ, ความเข้มข้นต่ำสุด

EFFICACY OF ENROFLOXACIN AGAINST BACTERIAL DISEASE IN BLACK TIGER SHRIMP (*PENAEUS MONODON*)

Juliwan Roongkamnertwongsa and Ussanee Ekpanithanpong
Coastal Aquatic Animal Health Research Institute, Pawong, Muang, Songkhla. 90100

ABSTRACT

The sensivity test of *Vibrio* spp. isolated from diseased black tiger shrimp (*P. monodon*) to Enrofloxacin was studied to determine its efficacy against vibriosis. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of enrofloxacin against thirty two strains of bacteria were found between 0.5-2 ppm. Experimental shrimp were fed with medicated (enrofloxacin) pellet at dosages of 2 and 3 g/kg of feed for seven days prior to intramuscular injection with *V.harveyi* suspention provided LD_{50} level at 96 h (4.09 x 10^8 cells). Survival rate was observed for seven days after injection. Shrimp fed with a high dose of medicate feed given a greater survival rate (75%) compared with low dose and control which were shown 55% and 35% survival rate.

Keywords : Enrofloxacin, vibriosis, black tiger shrimp (*P. monodon)*, MIC, *V.harveyi*

คำนำ

การเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอาชีพหลักอาชีพหนึ่งที่ได้รับความนิยมเลี้ยงต่อเนื่องกันมาหลายสิบปี เนื่องจากการให้ผลตอบแทนสูงเมื่อเทียบกับอาชีพเกษตรกรรมอื่น ๆ เกษตรกรได้พัฒนารูปแบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อพื้นที่สูงขึ้น ซึ่งในสภาพดังกล่าวส่งผลกระทบในทางลบต่อสุขภาพของกุ้งในบ่อเลี้ยง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบางพื้นที่ที่มีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำกันอย่างหนาแน่นและดำเนินการมาเป็นระยะเวลานานหลายๆปี เกิดการหมักหมมของของเสียจากอาหารที่ให้เกินอัตราการกินของกุ้งรวมทั้งขี้กุ้งและสารอื่นๆ ที่ขับออกมาในรูปของแก๊สพิษ สะสมอยู่ในน้ำและพื้นก้นบ่อ ทำให้เป็นแหล่งที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เกิดปัญหากุ้งติดเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงซึ่งมักพบตลอดระยะเวลาของการเลี้ยง จากการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* เป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในต่างประเทศหลายแห่งรวมถึงประเทศไต้หวัน (Kou *et al*., 1989; Chen *et al*.,1992) ฟิลิปปินส์ (Lavilla Pitogo *et al*.,1990; Baticados *et al*.,1990) ออสเตรเลียและอินโดนีเซีย (Owens and Hall-Mendelin, 1990; Owens *et al*.,1992) โรคแบคทีเรียเรืองแสงมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆโดยเริ่มจากการก่อโรคในลูกกุ้ง ต่อมานักวิจัยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงได้จากกุ้งเลี้ยงระยะ 2-4 เดือน (Ruangpan *et al*.,1995) จากการสังเกตการตายของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อรุนแรง มักมีสีของลำตัวเป็นสีแดงหรือชมพู อาจพบจุดสีดำขนาดเล็กตามลำตัว เนื่องจากเปลือกถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ไคติเนส (ชลอ, 2534) เกษตรกรแก้ปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะผสมกับอาหารให้กุ้งกินเพื่อบรรเทาอาการป่วยและเพื่อรักษาผลผลิตกุ้งในบ่อไว้จนถึงขนาดที่จะจับขึ้นจำหน่ายได้ หากเกษตรกรใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกวิธี ไม่ทราบถึงประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้ง ใช้ยาเกินขนาด อาจส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียเกิดการดื้อยาได้ โดยในปี พ.ศ. 2536 อมรชัย ได้รายงานผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยาออกโซลินิค แอซิค ที่สามารถยับยั้งเชื้อวิบริโอ พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.019-0.075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และในปีถัดมาค่า MIC ของยาออกโซลินิค แอซิค ต่อเชื้อวิบริโอมีค่าเท่ากับ 0.025-0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการดื้อยา และสอดคล้องกับรายงานของลิลาและคณะ (2540) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำและสิ่งแวดล้อมในแหล่งเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพเพิ่มขึ้นทุกปี

เอ็นโรฟลอกซาซินเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่มฟลูโอโรควิโนโลนอีกชนิดหนึ่งที่เกษตรกรให้ความสนใจนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำกันมาก แต่ข้อมูลทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับกุ้งกุลาดำยังน้อยมากโดยเฉพาะในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาเรื่องนี้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาเพื่อทราบประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินที่มีต่อโรคแบคทีเรียเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ รวมถึงการตอบสนองของเชื้อแบคทีเรียต่อยาเอ็นโรฟลอกซาซิน เพื่อเป็นข้อมูลที่เกษตรกรสามารถไปเป็นแนวทางปฏิบัติในการใช้ยาปฏิชีวนะชนิดนี้ในกุ้งกุลาดำอย่างได้ผล เมื่อมีความจำเป็นที่จะต้องใช้ในการรักษาโรค

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำโดยวิธี Minimal Inhibitory Concentration (MIC)
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำโดยผสมอาหารให้กิน

วิธีการศึกษา

1. การแยกชนิดเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่มีอาการป่วยเป็นโรคซึ่งเกษตรกรนำมาตรวจวินิจฉัยโรค ณ คลีนิคกุ้งทะเล ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าวไทย ในช่วงปี พ.ศ 2544-2545 โดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากตับ/ตับอ่อน (hepatopancreas) และกล้ามเนื้อ (muscle) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulphate-Citrate-Bilesalt-Sucrose Agar ที่มีเกลือ (NaCl) 1.5% (TCBS, Difco) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS จะนำไปเพาะเลี้ยงบน Nutrient Agar ที่มีเกลือ (NaCl) 1.5% (NA, Difco) เพื่อแยกเฉพาะ โคโลนีเรืองแสงเท่านั้น ตามวิธีของ Lavilla - Pitogo, และคณะ (1990) จากนั้นจึงนำไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ก่อนนำไปแยกชนิดและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีของดวงพร (2537), Buchanan และคณะ (1974) และ Colwell (1984)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินในการยับยั้งแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

2.1 การเตรียมยาเอ็นโรฟลอกซาซิน

เตรียมสารละลายยาตั้งต้น (stock solution) ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามวิธีของมาลิน (2532) โดยชั่งยาเอ็นโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin 97%, Sigma) มา 0.1031 กรัม ละลายใน 0.1N NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน จากนั้นเจือจางยาดังกล่าวให้ได้ระดับความเข้มข้นยา 11 ความเข้มข้น คือ 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางสารละลายยาตั้งต้นด้วยอาหาร Mueller Hinton broth ที่มีเกลือแกง 1.5% ในลักษณะลดลงครั้งละ 1/2 เท่า (2-fold dilution) ในหลอดทดสอบขนาด 13x100 มิลลิลิตร เตรียมยาระดับความเข้มข้นละ 4 หลอด

2.2. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยาเอ็นโรฟลอกซาซินที่มีต่อแบคทีเรียสกุล *Vibrio*

นำเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกชนิดได้ทั้งหมด มาทดลองตรวจสอบหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี Broth Dilution Susceptibility Tests (NCCLS,1991) โดยเพาะเชื้อแบคทีเรียใน Mueller Hinton broth ที่มีเกลือ (NaCl) 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เพาะได้มาเจือจางด้วย Mueller Hinton broth ที่มีเกลือ (NaCl) 1.5% ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 เจือจางอีกครั้งใช้อัตราส่วนเจือจาง 1:200 (เชื้อ:MHB) เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 7.5 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อที่เตรียมได้ดังกล่าวเติมลงในหลอดที่มียาระดับความเข้มข้นต่างๆ กันที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 โดยหยดลงหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เชื้อเข้ากับยา ส่วนหลอดควบคุม เป็นอาหาร Mueller Hinton broth ที่มีเกลือ 1.5% ไม่มียาผสมอยู่ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการทดลองโดยสังเกตความขุ่นของสารละลาย ถ้าสารละลายขุ่น แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นยังมีการเจริญ ส่วนหลอดที่สารละลายใส แสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นถูกยับยั้งการเจริญด้วยเอ็นโรฟลอกซาซินที่ความเข้มข้นนั้น บันทึกค่าความเข้มข้นของยาในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใสหลอดแรก และยืนยันผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอีกครั้ง โดยนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดใสหลอดแรกไปเพาะเชื้อแบคทีเรียอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ที่มีเกลือแกง (NaCl) 1.5%

3. การศึกษาประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินต่อเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำโดยผสมอาหารให้กิน

3.1 ตัวอย่างกุ้งทดลอง

ตัวอย่างกุ้งทดลองเป็นกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักประมาณ 10-15 กรัม ที่ไม่แสดงอาการป่วย นำตัวอย่างกุ้งดังกล่าวมาพักไว้ในห้องทดลองนาน 1 สัปดาห์ก่อนทดลองเพื่อให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อม ให้อาหารกุ้งกุลาดำอัดเม็ดสำเร็จรูปที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาด โดยให้ในอัตราส่วน 3% ของน้ำหนักตัว วันละ 4 ครั้ง เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันประมาณวันละ 30%

3.2 การเตรียมอาหารผสมยา

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารกุ้งกุลาดำอัดเม็ดสำเร็จรูป เบอร์ 4 ที่มีขายตามท้องตลาด นำมาผสมกับยาเอ็นโรฟลอกซาซิน 2 ระดับความเข้มข้น คือ 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมโดยละลายยาด้วย 0.1 N NaOH จนยาละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วฉีดพ่นผสมกับอาหารคลุกเคล้าให้ยาผสมกับอาหารอย่างทั่วถึง จากนั้นเคลือบด้วยน้ำมันตับปลาในอัตรา 30 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1

กิโลกรัม นำอาหารดังกล่าวไปผึ่งลมให้แห้ง เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตลอดการทดลอง

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินต่อเชื้อ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

การทดลองแบ่งเป็น 5 ชุดๆละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดที่ 1 ชุดควบคุมให้อาหารปกติและไม่ฉีดเชื้อแบคทีเรีย

ชุดที่ 2 ชุดควบคุมให้อาหารปกติและฉีดเชื้อแบคทีเรีย

ชุดที่ 3 ให้อาหารผสมยาในอัตราส่วน 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และฉีดเชื้อแบคทีเรีย

ชุดที่ 4 ให้อาหารผสมยาในอัตราส่วน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และฉีดเชื้อแบคทีเรีย

ชุดที่ 5 ชุดควบคุมให้อาหารปกติและฉีดน้ำเกลือ

นำกุ้งกุลาดำที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 แบ่งใส่ตู้ซึ่งจัดระบบการให้อากาศไว้พร้อมแล้ว ตู้ละ 20 ตัว กุ้งในชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 5 ให้อาหารปกติที่ไม่ผสมยา สำหรับชุดที่ 3 และ 4 ให้อาหารผสมยาที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ หลังจากให้อาหารครบ 7 วัน ทำการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* สายพันธุ์ที่ 6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทดสอบแล้วว่ามีความรุนแรงของเชื้อสูง โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อข้างลำตัวบริเวณรอยต่อระหว่างปล้องที่ 2 กับ 3 นับจากทางด้าน posterior ฉีดที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 4.09×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (96 h LD_{50}) ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว บันทึกข้อมูลอัตราการตายทุกวันเป็นเวลา 7 วัน นำกุ้งทดลองที่ตายในระหว่างการทดลองมาตรวจยืนยันการติดเชื้อ *V. harveyi* อีกครั้ง

ผลการศึกษา

1. การแยกชนิดเชื้อแบคทีเรีย

สามารถแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ได้จำนวน 32 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *V. harveyi* 20 สายพันธุ์, *V. alginolyticus* 10 สายพันธุ์และ *V. parahaemolyticus* 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยาเอ็นโรฟลอกซาซิน ต่อเชื้อ *Vibrio* จำนวน 32 สายพันธุ์

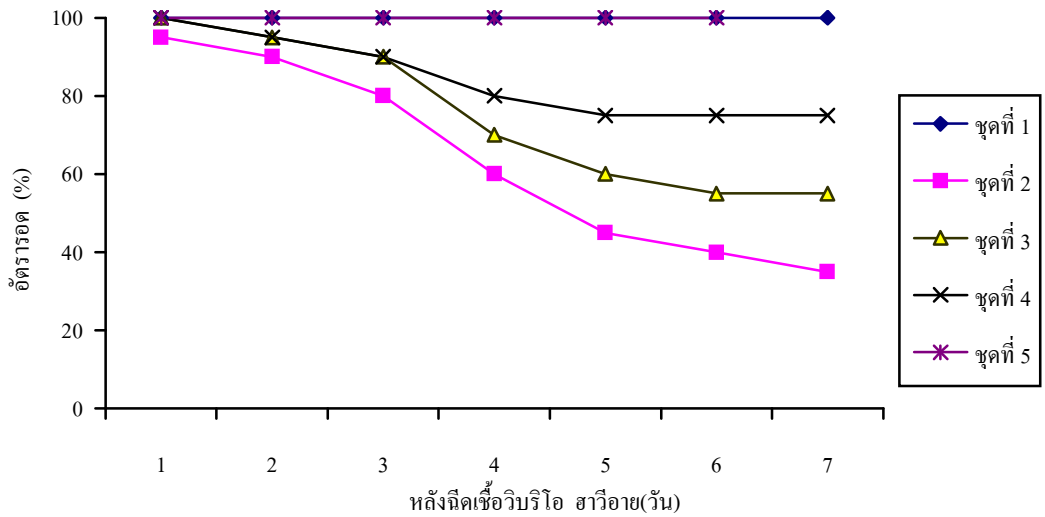
ลำดับที่	แบคทีเรียสกุล *Vibrio*	สายพันธุ์/แหล่งที่มา	ค่า MIC (ppm)
1	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 1/ ตับ	0.5
2	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 2/ ตับ	0.5
3	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 3/ กล้ามเนื้อ	0.5
4	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 4/ ตับ	2.0
5	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 5/ ตับ	2.0
6	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 6/ ตับ	2.0
7	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 7/ กล้ามเนื้อ	2.0
8	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 8/ ตับ	2.0
9	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 9/ ตับ	2.0
10	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 10/ ตับ	1.0
11	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 11/ ตับ	1.0
12	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 12/ ตับ	1.0
13	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 13/ ตับ	1.0
14	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 14/ กล้ามเนื้อ	1.0
15	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 15/ ตับ	1.0
16	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 16/ ตับ	1.0
17	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 17/ ตับ	1.0
18	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 18/ ตับ	1.0
19	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 19/ กล้ามเนื้อ	1.0
20	*V. harveyi*	สายพันธุ์ที่ 20/ ตับ	1.0
21	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 1/ ตับ	0.5
22	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 2/ ตับ	1.0
23	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 3/ ตับ	1.0
24	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 4/ ตับ	1.0
25	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 5/ ตับ	1.0
26	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 6/ กล้ามเนื้อ	1.0
27	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 7/ กล้ามเนื้อ	1.0
28	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 8/ ตับ	1.0
29	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 9/ ตับ	1.0
30	*V. alginolyticus*	สายพันธุ์ที่ 10/ ตับ	1.0
31	*V. parahaemolyticus*	สายพันธุ์ที่ 1/ ตับ	1.0
32	*V. parahaemolyticus*	สายพันธุ์ที่ 2/ ตับ	1.0

2. การทดสอบประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินในการยับยั้งแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ โดยวิธี Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

จากผลการศึกษาพบว่ายาเอ็นโรฟลอกซาซินสามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ทั้ง 20 สายพันธุ์ได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.5-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *V. harveyi* 3 สายพันธุ์ถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อ *V. harveyi* 11 สายพันธุ์ถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเชื้อ *V. harveyi* 6 สายพันธุ์ถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อแบคทีเรียในสกุล *V. alginolyticus* ทั้ง 10 สายพันธุ์ ถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 0.5-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *V. alginolyticus* 1 สายพันธุ์ถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอีก 9 สายพันธุ์ถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *V. parahaemolyticus* อีก 2 สายพันธุ์ถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(ตารางที่ 1)

3. การศึกษาประสิทธิภาพของยาเอ็นโรฟลอกซาซินต่อเชื้อ*V.harveyi* ในกุ้งกุลาดำโดยการผสมอาหารให้กิน

พบว่ายาเอ็นโรฟลอกซาซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ได้ โดยกุ้งในชุดการทดลองที่ให้อาหารผสมยาเอ็นโรฟลอกซาซินในอัตราส่วน 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอด 75% และกุ้งชุดที่ให้อาหารผสมยาเอ็นโรฟลอกซาซินในอัตราส่วน 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอด 55% ซึ่งมีอัตรารอดตายสูงกว่ากุ้งในชุดการทดลองที่ไม่ได้ให้อาหารผสมยาเอ็นโรฟลอกซาซิน พบว่ามีอัตรารอดเพียง 35% เท่านั้น (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 อัตรารอดของกุ้งกุลาดำที่ได้รับยาเอ็นโรฟลอกซาซินในระดับต่างกัน หลังจากฉีดเชื้อ *V. harveyi* เป็นระยะเวลา 7 วัน

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาการตอบสนองของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ที่มีต่อยาเอ็นโรฟลอกซาซินในครั้งนี้ พบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) อยู่ระหว่าง 0.5-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองหาค่า MIC ของยาเอ็นโรฟลอกซาซินต่อเชื้อ *E. coli* ในทางเดินปัสสาวะของสุนัขอยู่ในช่วง 0.06-2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Bayer, US) จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า แบคทีเรียสกุลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์มีค่า MIC แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งเลี้ยงที่ต่างกันอาจใช้ยามากน้อยต่างกันหรืออาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางคุณสมบัติเฉพาะตัวของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ เช่นเดียวกับการทดลองของพรเลิศและคณะ (2538) ที่พบว่าค่า MIC ของโรเมต-30 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสกุลวิบริโอจำนวน 20 สายพันธุ์ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-2.0 ส่วนในล้านส่วน นอกจากนั้นลิลาและคณะ (2540) ยังพบว่าจากการตรวจสอบประสิทธิภาพของยารักษาโรคกุ้งกุลาดำในท้องตลาด โดยการหาค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและวิบริโอจำนวน 30 สายพันธุ์ ปรากฏว่าค่า MIC ของยาที่มีผลต่อแบคทีเรียเรืองแสงและวิบริโอมีค่าอยู่ในช่วง 1.2 -> 100 และ0.8-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า MIC ที่ได้ยังคงอยู่ในระดับต่ำ ยังไม่เกิดปัญหาการดื้อยาเกิดขึ้น

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ายาเอ็นโรฟลอกซาซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ค่อนข้างดี เนื่องจากพบว่ากุ้งทดลองที่ได้รับอาหารผสมยาในอัตราส่วน 3.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอด 75% เมื่อเทียบกับกุ้งทดลองที่ไม่ได้รับยาซึ่งมีอัตรารอดเพียง 35% จากอัตราส่วนของยาที่ผสมในอาหารให้กุ้งกุลาดำกินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในครั้งนี้ค่อนข้างสูงกว่าอัตราส่วนที่ใช้ในสัตว์อื่น เช่นในสุนัขและแมวโดยทั่วไปจะใช้กินในปริมาณ 5-20 กรัมต่อน้ำหนักตัว (Bayer, US) เนื่องจากกุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำที่มีพฤติกรรมการกินอาหารที่ค่อนข้างช้าโดยจะค่อยๆแทะเล็มกินอาหารทีละน้อย ซึ่งใช้เวลาในการกินอาหารมื้อละประมาณ 30-60 นาที ดังนั้นช่วงเวลาระหว่างที่กุ้งกินอาหาร ยาจะถูกละลายสูญเสียไปในน้ำเป็นปริมาณมากจึงมีผลต่อปริมาณยาที่กุ้งจะได้รับ นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงที่กุ้งกำลังเป็นโรคการกินอาหารของกุ้งก็จะลดลง จึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณของยาที่ผสมกับอาหารเพิ่มขึ้นไปอีก ปริมาณยาปฏิชีวนะผสมในอาหารให้กุ้งกุลาดำกินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยทั่วไปใช้กินประมาณ 3-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จากการทดลองของพรเลิศและคณะ(2538) พบว่าค่า MIC ของยาโรเมต-30 ต่อเชื้อ *Vibrio* sp. อยู่ระหว่าง 0.5-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทดลองผสมยากับอาหารในอัตราส่วน 2 และ 3.3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมให้กุ้งกินพบว่าประสิทธิภาพของยาโรเมต-30ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ในอัตราส่วน 3.3 กรัมดีกว่าในอัตราส่วน 2 กรัม สำหรับอัตราการใช้ยาออกซีเตตร้าซัยคลินผสมกับอาหารเพื่อรักษาโรคติดเชื้อ *Vibrio* sp. ในกุ้งกุลาดำ เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้ในอัตราส่วน 3-5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (พรเลิศ, 2538) นอกจากนี้จากรายงานของโสภณ (2544) พบว่าการผสมออกซีเตตร้าซัยคลินกับอาหารเม็ดให้กุ้งกิน กุ้งจะไม่ได้รับยาตามระดับความเข้มข้นที่แท้จริงที่ผสมในอาหาร เนื่องจากสูญเสียในขั้นตอนการเตรียมอาหารผสมยา 35-60 เปอร์เซนต์, การละลายของยาลงสู่น้ำขึ้นอยู่กับความเค็มของน้ำและระยะเวลาที่อาหารแช่อยู่ใน

น้ำ ประสิทธิภาพของยาในการรักษานอกจากจะขึ้นกับปริมาณยาแล้ว ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ เช่น การดูดซึมของยา เป็นต้น

จากผลการทดลองครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการให้คำแนะนำแก่เกษตรกรในการใช้ยาเอ็นโรฟลอกซาซินผสมอาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปในอัตราส่วน 3.0 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถยับยั้งการติดเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งปริมาณยาที่ใช้ไม่สูงมาก สอดคล้องกับรายงานของเมตตา (2544) ที่กล่าวว่าหากใช้ยาชนิดนี้ในปริมาณมากๆจะทำให้ฤทธิ์ของยาลดลงการรักษาจะไม่ได้ผล อย่างไรก็ตามหากจะใช้ยาเอ็นโรฟลอกซาซินรวมทั้งยาในกลุ่ม Fluoroquinolone เพื่อรักษาโรคในกุ้งกุลาดำ ควรมีการศึกษาถึงผลกระทบที่เกิดขึ้น เช่น การแพร่กระจายของยา การตกค้าง การดื้อยาของแบคทีเรียรวมทั้งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในการใช้ยาจำเป็นต้องทราบข้อมูลเฉพาะของยาแต่ละชนิด เพื่อประโยชน์ที่จะได้รับจากการใช้ยา

เอกสารอ้างอิง

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2534. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ฐานเศรษฐกิจ, กรุงเทพฯ. 202 หน้า.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 202 หน้า.

พรเลิศ จันทร์ชัชชกูล. 2538. การใช้ยาและสารเคมีบางชนิดในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารข่าวโรคสัตว์น้ำ **5** : หน้า 14-16.

พรเลิศ จันทร์ชัชชกูล, เจติยา โรจนศิริ, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, K. Kurmaly และ G. F. Ci. 2538. ประสิทธิภาพของโรเมต-30ในการป้องกันโรคในกุ้งกุลาดำ. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2538. กรมประมง. กรุงเทพฯ. หน้า 584-589.

มาลิน จุลศิริ. 2532. ยาต้านจุลชีพ :ความรู้พื้นฐานและประยุกต์. โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต, กรุงเทพฯ. 173 หน้า

เมตตา เมฆานนท์. 2544. กุ้งเอเชี่ยน, **6(13):** หน้า 19-23.

ลิลา เรืองแป้น ,สถาพร ดิเรกบุษราคม, เยาวนิตย์ ดนยดล และยุบลรัตน์ ศรีแก้ว. 2540. ประสิทธิภาพของยารักษาโรคกุ้งกุลาดำในท้องตลาดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเรืองแสงและวิบริโอ.เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2540. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 10 หน้า.

โสภณ อ่อนคง. 2544. อาหารผสมออกซีเตตร้าซัยคลินกับการตกค้างของยาในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 78 หน้า.

อมรชัย สมเจตน์เลิศเจริญ. 2536. การศึกษาชนิดของเชื้อวิบริโอ และการตกค้างของยาออกโซลินิค แอซิด ในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 121 หน้า.

Baticados, M.C.L., C.R. Lavilla-Pitoco, L.D.de. la Pena, and N.A. Sunaz.1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Diseases of Aquatic organisms **9**:133-139.

Baytril antibacterial tablets and injectable solution package insert (Bayer-US), Rev **11/96**, Rec 12/3/96.

Buchanan, R.E., N.E. Gibbon, S.T. Cowan, J.G. Holt, J.Liston, R.G.E. Murray, A.W. Ravin and R.Y. Stanier. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed. The Williams and Wilkins Co, Baltimore. 1490 .

Chen, S.N., S.L. Huang and G.H. Kou. 1992. Studies on the epizoology and pathogenicity of bacterial infections in cultured gaint tiger prawn *Penaeus monodon* in Taiwan. P. 195-205.**In**: Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. Fulks & Main (eds.) Honolulu, Hawaii.

Colwell, R.R. 1984. Vibrios in the Environment. John Wiley& Sons, Inc., New York. 643 .

Kou, G.H., S.H Chen, and S.L.Huang. 1989. Studies on bacterial infection for culture *Penaeus monodon*. p.8. **In**: Abstract of ROC-JAPAN symposium on fish diseases. 6-7 Nov. 1989. Taipei, Taiwan.

Lavilla-Pitogo, C.R., M.CL. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda, and L.D. de la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. Aquaculture **91**:1-13.

NCCLS.1991.Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically:Second Edition NCCLS Document M7-A2.**10(8)**:31.

Owens, L., and S. hall-mendelin. 1990. Recent advances in Australian prawn diseases and pathology. Advances in tropical Aqua. IFREMER. Actes de Colloques **9**:103-112.

Owens, L., P. Muir, and D. Sutton. 1992. The pathology of microbial diseases in tropical Australian Crustacea. P. 165-172. **In**: Diseases in Asian Aqua. I. M. Shariff, et al. (eds.). Fish Health Sect., Asian Fish. Soc. Manila, Philippines.

Ruangpan, L., R. Tabkaew, and K. Sangrungruang. 1995. Bacterial flora of ponds with different stocking densities of black tiger shrimp, Penaeus monodon p. 141-149. **In** : Disease in Asian Aqua. II. M. Shariff, et al. (eds.). Fish Health Sect., Asian Fish. Soc. Manila,Philippines.