นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาระดับของยาปฏิชีวนะในซีรั่มปลาคาร์พและผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

Determination of antibiotic concentration in carps' sera against gram positive and gram negative bacteria

ดานิศ ทวีติยานนท์[1] วรา พานิชเกรียงไกร[1] วิลารัตน์ คำเมือง[2]
อรวรรณ นวีภาพ[3] ศิรินทร หยิบโชคอนันต์[1] สุรัชนี เศวตสิลา[2]

Abstract : **Danis Davitiyananda, Wara Panichkriangkrai, Wirarat Kummuang, Orawan Navephab, Sirintorn Yibchokanan and Suratchanee Savetsila. 1995. Determination of antibiotic concentration in carps' sera against gram positive and gram negative bacteria. Thai J Hlth Resch 9(1) : 17 - 29**

Two kinds of antibiotic, Erythromycin and Kanamycin, were experimentally studied in 147 carps which ranging from 20-25 cm long. Fishes were divided into 7 groups, 1 control and 3 groups per antibiotic, consisting of 21 fishes per group. Dosages of 5, 10 and 15 mg/kg body weight of each antibiotic were intramuscularly injected into experimental groups respectively. Blood samples were collected, 3 fishes per sample, at 1, 3, 6, 24, 36 and 48 hours post injecttion. Sera of each group as mention time were pooled together. Bioassay was used for antibiotic concentration determination in sera. The efficiency of antibiotic in sera against gram positive and gram negative bacteria were tested by agar-gel diffusion. The results were found that the half-life of Erythromycin and Kanamycin in carps were 11 and 15 hours respectively which being longer than in livestocks and pets. Erythromycin was not effective at the dose of 5 mg/kg but at the doses of 10 and 15 mg/kg were effective against E. coli which was gram negative bacteria. Kanamycin was not effective against gram positive and gram negative as the dosages designed.

Key words : *Erythromycin; Kanamycin; Carps'sera; Gram positive and gram negative bacteria*

[1]ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
Dept of Veterinary Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

[2]กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000
Div of Drug Analysis, Department of Medical Science, Ministry of Health, Nonthaburi 11000.

[3]หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 10330
Div of Microbiology, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

บทคัดย่อ : **ดานิศ ทวีติยานนท์, วรา พานิชเกรียงไกร, วิลารัตน์ คำเมือง, อรวรรณ นวีภาพ, ศิรินทร หยิบโชคอนันต์ และ สุรัชนี เศวตสิลา. 2538. การศึกษาระดับของยาปฏิชีวนะในซีรั่มปลาคาร์พและผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 9(1) : 17-29**

*ทำการทดลองฉีดยาปฏิชีวนะสองชนิด คือ Erythromycin และ Kanamycin เข้ากล้ามเนื้อปลาคาร์พที่มีขนาดระหว่าง 20-25 ซม. รวม 147 ตัว โดยแบ่งออก 7 กลุ่ม ๆ ละ 21 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลองฉีดปฏิชีวนะชนิดละ 3 กลุ่ม ด้วยขนาด 5, 10 และ 15 มก./น.น. ตัว 1 กก. ตามลำดับ เจาะเลือดทุกกลุ่ม ๆ ละ 3 ตัวมารวมกัน หลังฉีดปฏิชีวนะที่ 1, 3, 6, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อหาระดับความเข้มข้นของยาในซีรั่มด้วยวิธีการ Bioassay และทดสอบปฏิชีวนะในซีรั่มที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยวิธีการ agar-gel diffusion พบว่าครึ่งชีวิตของปฏิชีวนะในปลาคาร์พนานกว่าในสัตว์เศรษฐกิจ หรือสัตว์เลี้ยงอื่น ๆ คือ ค่าครึ่งชีวิตของ Erythromycin นาน 11 ชั่วโมง และ Kanamycin นาน 15 ชั่วโมง ผลในการระงับการเจริญของแบคทีเรียที่ขนาด 5 มก./กก. ของ Erythromycin ไม่ได้ผล แต่ขนาด 10 และ 15 มก./กก. มีผลกับ **E. coli** ที่เป็นแกรมลบอย่างเดียวเท่านั้น ส่วน Kanamycin ทั้งขนาด 5, 10 และ 15 มก./กก. ไม่มีผลต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบในขนาดที่กำหนดขึ้น*

คำสำคัญ : *อีริโทรมัยซิน; กานามัยซิน; ซีรั่มปลาคาร์พ; แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ*

บทนำ

ปลาคาร์พเป็นปลาที่เลี้ยงไว้เพื่อความสวยงามและเป็นที่นิยมอย่างยิ่งในปัจจุบัน ประกอบกับปลาคาร์พเป็นปลาที่มีราคาแพง ดังนั้นการเลี้ยงและดูแลปลาคาร์พจึงต้องทำอย่างระมัดระวังมาก จากการศึกษาของเกรียงศักดิ์ และ โสมทัต (2525) พบว่า มีรายงานถึงโรคของปลาคาร์พจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และได้รับการรักษาโดยยาปฏิชีวนะหลายชนิด ตลอดจนมีการพบเชื้อที่ดื้อต่อยาเหล่านั้น ปลาคาร์พเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่และมักเลี้ยงจำนวนไม่มากนัก เมื่อมีการติดเชื้อหรือเป็นโรค จึงนิยมใช้การรักษาโดยการฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งบริเวณที่ควรฉีดจะเป็นบริเวณระหว่างตาปลากับก้านครีบหลัง (ปัญญา, 2531)

Erythromycin และ Kanamycin เป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียของสัตว์ต่าง ๆ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ ม้า สุกร และอื่น ๆ โดยจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย ยาปฏิชีวนะ Erythromycin จัดอยู่ในกลุ่ม Macrolides ออกฤทธิ์กดการเจริญเติบโตของเชื้อ และอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียตายได้ หากความเข้มข้นของยาสูงพอและเชื้อมีความไวต่อยาชนิดนี้ ยานี้ออกฤทธิ์ได้ดีในภาวะที่เป็นด่าง กลไกการออกฤทธิ์จะขัดขวางการสร้างโปรตีนโดยจับกับ 50 s ribosomal subunit ของเชื้อแบคทีเรีย ส่วน Kanamycin เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides ออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียตาย (bactericidal) โดยที่ยาจะเข้าไปจับกับ 30 s ribosomal subunit ของแบคทีเรีย มีผลไปขัดขวางการสร้างโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของเชื้อ Kanamycin ออกฤทธิ์ได้ดีในภาวะด่าง และต้องอาศัยออกซิเจนในขบวนการ active transport ของยาเข้าสู่เซลล์ด้วย ดังนั้นยาจะออกฤทธิ์ในภาวะแวดล้อมที่ขาดออกซิเจนหรือในการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ

anaerobes ไม่ได้ จากการที่ยาปฏิชีวนะทั้งสองดังกล่าว ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและลบ จึงเป็นที่นิยมใช้ในสัตว์หลายชนิด Kanamycin เป็นยาปฏิชีวนะที่ดูดซึมไม่ดีจากทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงให้โดยการฉีดเท่านั้น ส่วน Erythromycin สามารถให้สัตว์กินหรือฉีดเข้าร่างกายได้

จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาหาระดับยาปฏิชีวนะ Erythromycin และ Kanamycin ในปลาคาร์พ โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในปริมาณต่าง ๆ กัน และเจาะเลือดปลาเพื่อนำซีรั่มมาศึกษาผลของยาในระดับยาต่าง ๆ ที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ หาค่าครึ่งชีวิตของยาในปลาคาร์พ เพื่อให้ทราบว่าควรจะให้ยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียของปลาคาร์พในขนาดเท่าใดและให้กี่ครั้งต่อวัน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

แบ่งปลาคาร์พขนาดลำตัวยาวประมาณ 20 - 25 ซม. จำนวน 147 ตัว ออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 21 ตัว โดยเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลองหรือกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Erythromycin หรือ Kanamycin จำนวน 6 กลุ่ม

กลุ่มควบคุม

ปลาคาร์พกลุ่มนี้ จำนวน 21 ตัว เลี้ยงเป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้ฉีดสารอะไรเลย

กลุ่มที่ได้รับยา

กลุ่มที่ 1 ปลาคาร์พได้รับ Erythromycin โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในขนาด 5 mg/kg จำนวน 21 ตัว
กลุ่มที่ 2 ปลาคาร์พได้รับ Erythromycin โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในขนาด 10 mg/kg จำนวน 21 ตัว
กลุ่มที่ 3 ปลาคาร์พได้รับ Erythromycin โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในขนาด 15 mg/kg จำนวน 21 ตัว
กลุ่มที่ 4 ปลาคาร์พได้รับ Kanamycin โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในขนาด 5 mg/kg จำนวน 21 ตัว
กลุ่มที่ 5 ปลาคาร์พได้รับ Kanamycin โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในขนาด 10 mg/kg จำนวน 21 ตัว
กลุ่มที่ 6 ปลาคาร์พได้รับ Kanamycin โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อในขนาด 15 mg/kg จำนวน 21 ตัว

วางยาสลบปลาคาร์พด้วย Quinaldine ของ Fluka Chemic AG แล้วจึงเจาะเลือดปลาก่อนได้รับยากลุ่มละ 3 ตัว นำเลือดที่ได้แต่ละกลุ่มมารวมกันเก็บไว้ และเจาะเลือดหลังจากฉีดยาให้ปลาแล้วที่ 1, 3, 6, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ครั้งละ 3 ตัว/กลุ่ม

จากนั้นนำเลือดที่เจาะได้ทิ้งให้แข็งตัว เพื่อแยกซีรั่มออกและนำไปเก็บที่ -20° ซ. ก่อนนำไปตรวจหาระดับยาโดยใช้วิธี Bioassay และศึกษาผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก *(Streptococcus* spp. และ *Bacillus cereus)* และแกรมลบ *(Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila)* ในจานเลี้ยงเชื้อ *(in vitro)* ต่อไป

การตรวจวัดระดับยาในซีรั่มโดยวิธี bioassay (Bailly, 1974; Barry, 1976; Hugo and Russell, 1983)

1. **การเตรียม working standard** ละลาย Erythromycin standard ใน methanol ให้มีความเข้มข้น 10 mg/ml เจือจางสารละลายนี้ด้วย 0.1 M potassium phosphate pH 8.0 ให้เหลือความเข้มข้นเป็น 0.1 mg ของ Erythromycin base/ml แล้วเจือจางสารละลายนี้ด้วย inactivated horse serum ให้มี 2 fold dilutions จะได้ความเข้มข้นของ Erythromycin เป็น 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 และ 0.25 mcg/ml ตามลำดับ

การตรวจวัดระดับ *Erythromycin* ในซีรั่ม นำ *Micrococcus luteus* strain ATCC 9341 จำนวน 15 ml ไปเลี้ยงใน agar slants ที่มี antibiotic medium No.1 นำไป incubate ที่ 32°-35° ซ. นาน 24 ชม. ล้างเชื้อที่เจริญเติบโตจากผิว agar ด้วย sterile U.S.P. saline (T.S.) จากการวัดสีด้วย photoelectric colorimeter ให้แสงผ่านได้ 25% ที่ความยาวคลื่น 580 nanometers

นำ petridish ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 mm ที่ได้เติม standardized inoculum 1 ml ลงใน mediu และได้ทำการเจาะหลุมขนาด 4 mm จำนวน 11 หลุม/plate มาอย่างน้อย 4 plates สำหรับแต่ละการทดลอ ใน 5 หลุมของแต่ละ plate จำนวน 3 plates จะเติมแต่ละหลุมด้วย 50 μl standard solution อีก 5 หลุมจะเติ ซีรั่มปลาคาร์พที่เก็บได้ที่ต่างเวลาตามกำหนด ส่วนอีกหลุมที่เหลือให้เติม standard solution ของ Erythromyci base ที่ความเข้มข้น 2.0 mcg/ml เพื่อไว้ตรวจสอบความคลาดเคลื่อนกับ S_2 ส่วนอีก 1 plate ที่เหลือจะใ ซีรั่มปลาคาร์พที่เวลาต่าง ๆ ทั้ง 11 หลุม (Figure 1)

ทิ้ง plates ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. เพื่อให้ปฏิชีวนะกระจายทั่ว medium แล้วจึงนำไป incubate 32°-35° ซ. นาน 16-18 ชม. วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (clear zone) ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะมีค inhibition zone 3 ค่าของแต่ละความเข้มข้น นำไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อ plot standard curve นำค่าเฉลี่ยที่วัดได้จา ซีรั่มปลาคาร์พมาเปรียบเทียบค่ากับ standard curve ก็จะทราบระดับความเข้มข้นของ Erythromycin ในซีร ปลาคาร์พได้

2. **การเตรียม working standard** ละลาย Kanamycin working standard ด้วย 1.0% potassium phospha buffer pH 6.0 ให้มีความเข้มข้น 1,000 mcg/ml ของ Kanamycin base จากนั้นเจือจางด้วย inactivated hor serum ให้มี 2 fold dilutions จะได้ความเข้มข้นของ Kanamycin เป็น 12.0, 6.0, 3.0, 1.5 และ 0.75 mcg/ ตามลำดับ

การตรวจวัดระดับ Kanamycin ในซีรั่ม นำ *Bacillus subtilis* strain ATCC 6633 จำนวน 15 ml ไ เลี้ยงใน agar slants ที่มี antibiotic medium No. 1 นำไป incubate ที่ 32°-35° ซ. นาน 24 ชม. ล้างเชื้อ เจริญบนผิว agar ด้วย sterile U.S.P. saline T.S. 3 ml ลงใน Roux bottle แล้วเติม antibiotic medium No. ลงไป 250 ml นำ Roux bottle ไป incubate ที่ 32°-35° ซ. นาน 5 วัน ล้างเชื้อที่เจริญที่ผิว agar ด้วย steri U.S.P. saline T.S. 50 ml จากนั้นอุ่น suspension ที่ได้ให้ร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 70° ซ. นาน 30 นาที ล้าง spo suspension ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 25-50 ml 3 ครั้ง จะได้สารแขวนลอยของ *Bacillus subtilis* 50-70 ml ใ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ซึ่งจะนำไปทำสารแขวนลอยมาตรฐาน ด้วย photoelectric colorimeter โดยให้แสงผ่านได้ 25 ที่ความยาวคลื่น 580 nanometers ซึ่งแต่ละ 100 ml ของ agar จะเติม spore suspension 0.05 ml

การเตรียม plates ทำเช่นเดียวกับการหา Erythromycin เพียงแต่ใช้ 0.05 ml ของ spore suspensi ใน 100 ml ของ agar แทน วิธีการหา standard curve และทดสอบหาระดับยาในซีรั่มในปลาคาร์พก็เช่นเดี กับการหา Erythromycin คือ นำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ของตัวอย่างมาอ่านเปรียบเท กับค่า standard curve

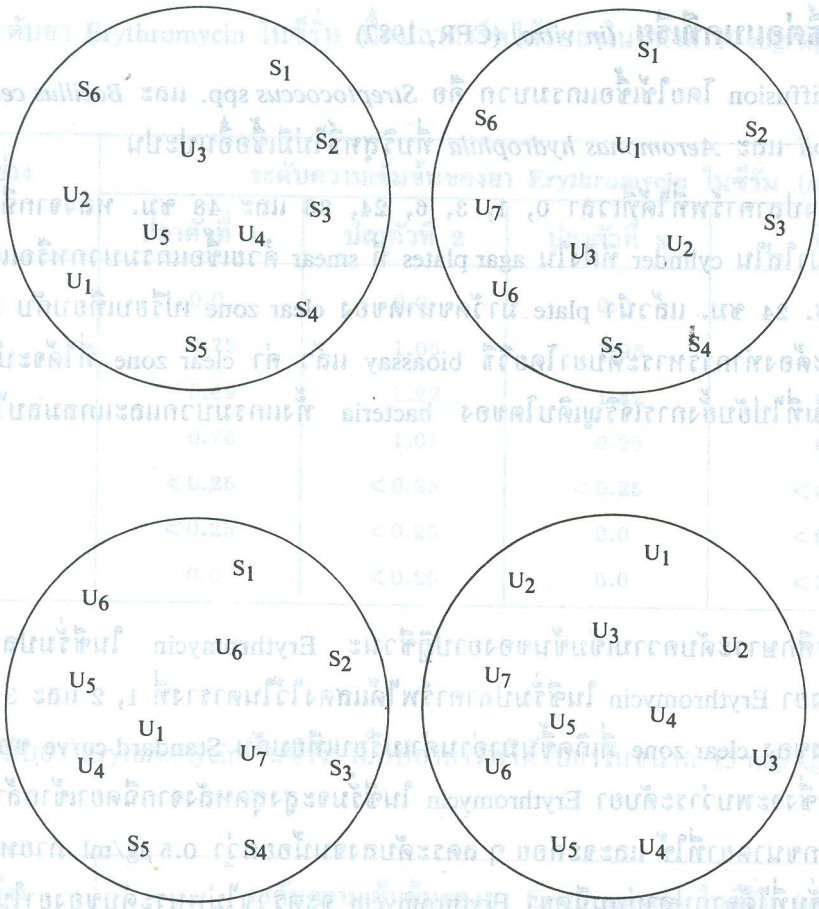


Figure 1 Bioassay procedure pattern

หมายเหตุ

S_1 = Standard concentration of erythromycin base ที่ 4.0 mcg/ml
S_2 = Standard concentration of erythromycin base ที่ 2.0 mcg/ml
S_3 = Standard concentration of erythromycin base ที่ 1.0 mcg/ml
S_4 = Standard concentration of erythromycin base ที่ 0.5 mcg/ml
S_5 = Standard concentration of erythromycin base ที่ 0.25 mcg/ml
S_6 = Standard concentration of erythromycin base ที่ 2.0 mcg/ml
U_1 = Carps' serum level of erythromycin ก่อนฉีดยา
U_2 = Carps' serum level of erythromycin 1 ชั่วโมง หลังจากฉีดยา
U_3 = Carps' serum level of erythromycin 3 ชั่วโมง หลังจากฉีดยา
U_4 = Carps' serum level of erythromycin 6 ชั่วโมง หลังจากฉีดยา
U_5 = Carps' serum level of erythromycin 24 ชั่วโมง หลังจากฉีดยา
U_6 = Carps' serum level of erythromycin 36 ชั่วโมง หลังจากฉีดยา
U_7 = Carps' serum level of erythromycin 48 ชั่วโมง หลังจากฉีดยา

วิธีการศึกษาฤทธิ์ต่อแบคทีเรีย *(in vitro)* (CFR, 1987)

วิธี agar diffusion โดยใช้เชื้อแกรมบวก คือ *Streptococcus* spp. และ *Bacillus cereus* เชื้อแกรมลบ คือ *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* ที่บริสุทธิ์ไม่มีเชื้ออื่นปะปน

นำซีรั่มของปลาคาร์พที่ได้ที่เวลา 0, 1, 3, 6, 24, 36 และ 48 ชม. หลังจากฉีดยา Erythromycin หรือ Kanamycin มาใส่ใน cylinder ที่ฝังใน agar plates ที่ smear ด้วยเชื้อแกรมบวกหรือแกรมลบตามต้องการ incubate ที่ 36° ซ. 24 ชม. แล้วนำ plate มาวัดขนาดของ clear zone เปรียบเทียบกับ standard ของยาแต่ละตัว ทั้งนี้ซีรั่มจะต้องทำการหาระดับยาโดยวิธี bioassay แล้ว ค่า clear zone ที่ได้จะบ่งชี้ถึงความสามารถของระดับยาในซีรั่มที่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของ bacteria ทั้งแกรมบวกและแกลมลบได้ในเวลาต่าง ๆ กัน หลังฉีดยา

ผล

1. ผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ Erythromycin ในซีรั่มปลาคาร์พที่เวลาต่าง ๆ ค่าความเข้มข้นของยา Erythromycin ในซีรั่มปลาคาร์พได้แสดงไว้ในตารางที่ 1, 2 และ 3 เป็นค่าที่ได้จากการนำเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้นมาอ่านค่าเปรียบเทียบกับ Standard curve ของ Erythromycin ที่ได้จากการทดลอง ซึ่งจะพบว่าระดับยา Erythromycin ในซีรั่มจะสูงสุดหลังจากฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อของปลาคาร์พแล้ว 1 ชม. ของทุกขนาดยาที่ใช้ และจะค่อย ๆ ลดระดับลงจนน้อยกว่า 0.5 μg/ml ภายหลังจากฉีดยาไปแล้ว 24 ชม. ส่วนในซีรั่มที่ได้จากปลาก่อนฉีดยา Erythromycin จะตรวจไม่พบระดับของยาในซีรั่ม

ตารางที่ 1 แสดงระดับยา Erythromycin ในซีรั่ม เมื่อปลาคาร์พได้รับยาในขนาด 5 mg/kg ที่เวลาต่าง ๆ กัน

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นของยา Erythromycin ในซีรั่ม (μg/ml)			
	ปลาตัวที่ 1	ปลาตัวที่ 2	ปลาตัวที่ 3	$\bar{X} \pm$ S.D.
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	0.72	1.12	1.04	0.96 ± 0.21
3	0.63	1.14	0.49	0.75 ± 0.34
6	0.61	0.94	0.36	0.64 ± 0.29
24	0.0	0.24	0.25	0.15 ± 0.13
36	0.0	0.25	0.0	0.08 ± 0.14
48	0.0	0.0	0.0	0.0

ตารางที่ 2 แสดงระดับยา Erythromycin ในซีรั่ม เมื่อปลาคาร์พได้รับยาในขนาด 10 mg/kg ที่เวลาต่าง ๆ กัน

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นของยา Erythromycin ในซีรั่ม (μg/ml)			
	ปลาตัวที่ 1	ปลาตัวที่ 2	ปลาตัวที่ 3	$\bar{X} \pm$ S.D.
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	0.72	1.05	1.96	1.24 $\pm$ 0.64
3	0.49	1.22	1.42	0.04 $\pm$ 0.49
6	0.76	1.01	0.25	0.67 $\pm$ 0.39
24	$<$0.25	$<$0.25	$<$0.25	$<$0.25 $\pm$ 0.00
36	$<$0.25	$<$0.25	0.0	$<$0.17 $\pm$ 0.14
48	0.0	$<$0.25	0.0	$<$0.08 $\pm$ 0.14

ตารางที่ 3 แสดงระดับยา Erythromycin ในซีรั่ม เมื่อปลาคาร์พได้รับยาในขนาด 15 mg/kg ที่เวลาต่าง ๆ กัน

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นของยา Erythromycin ในซีรั่ม (μg/ml)			
	ปลาตัวที่ 1	ปลาตัวที่ 2	ปลาตัวที่ 3	$\bar{X} \pm$ S.D.
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	1.85	1.62	3.30	2.26 $\pm$ 0.91
3	1.25	1.62	2.40	1.76 $\pm$ 0.59
6	1.36	1.42	1.80	1.53 $\pm$ 0.23
24	$<$0.25	0.29	1.12	0.55 $\pm$ 0.49
36	$<$0.25	$<$0.25	$<$0.25	$<$0.25 $\pm$ 0.00
48	0.0	$<$0.25	$<$0.25	$<$0.17 $\pm$ 0.14

2. ผลการศึกษาระดับยาปฏิชีวนะ Kanamycin ในซีรั่มปลาคาร์พที่เวลาต่าง ๆ ค่าความเข้มข้นของยา Kanamycin ในซีรั่มปลาคาร์พได้แสดงไว้ในตารางที่ 4, 5 และ 6 เป็นค่าที่ได้จากการนำเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้นมาอ่านค่าเปรียบเทียบกับ standard curve ของ Kanamycin ที่ได้จากการทดลองเช่นกัน ซึ่งจะพบว่าในซีรั่มของปลาคาร์พที่ได้จากปลาก่อนฉีดยา Kanamycin จะตรวจไม่พบระดับยาในซีรั่ม ในขณะที่ระดับของยา Kanamycin ในซีรั่มปลาคาร์พจะสูงสุดหลังจากฉีดยาไปแล้ว 1 ชม. ของทุกขนาดยาที่ใช้ และยังคงสามารถตรวจพบได้ในระดับค่อนข้างสูง (2.65 μg/ml) หลังจากฉีดยา Kanamycin ในขนาด 15 mg/kg ให้ปลาคาร์พนาน 48 ชม.

ตารางที่ 4 แสดงระดับยา Kanamycin ในซีรั่ม เมื่อปลาคาร์พได้รับยาในขนาด 5 mg/kg ที่เวลาต่าง ๆ กัน

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นของยา Kanamycin ในซีรั่ม (μg/ml)			
	ปลาตัวที่ 1	ปลาตัวที่ 2	ปลาตัวที่ 3	$\bar{X} \pm$ S.D.
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	9.9	10.5	16.5	12.3 ± 3.65
3	8.9	9.1	11.0	9.67 ± 1.16
6	8.6	8.2	8.8	8.53 ± 0.31
24	5.0	5.2	2.45	4.22 ± 1.53
36	2.0	2.15	1.75	1.97 ± 0.20
48	1.22	1.90	1.48	1.53 ± 0.34

ตารางที่ 5 แสดงระดับยา Kanamycin ในซีรั่ม เมื่อปลาคาร์พได้รับยาในขนาด 10 mg/kg ที่เวลาต่าง ๆ กัน

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นของยา Kanamycin ในซีรั่ม (μg/ml)			
	ปลาตัวที่ 1	ปลาตัวที่ 2	ปลาตัวที่ 3	$\bar{X} \pm$ S.D.
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	19.8	12.3	24.5	18.87 ± 6.15
3	18.5	10.6	16.5	15.20 ± 4.11
6	17.0	5.80	12.0	11.60 ± 5.61
24	7.2	5.35	9.2	7.25 ± 1.93
36	3.8	3.45	3.5	3.58 ± 0.19
48	1.62	2.45	1.75	1.94 ± 0.45

ตารางที่ 6 แสดงระดับยา Kanamycin ในซีรั่ม เมื่อปลาคาร์พได้รับยาในขนาด 15 mg/kg ที่เวลาต่าง ๆ กัน

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชั่วโมง)	ระดับความเข้มข้นของยา Kanamcin ในซีรั่ม (μg/ml)			
	ปลาตัวที่ 1	ปลาตัวที่ 2	ปลาตัวที่ 3	$\bar{X} \pm$ S.D.
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	35.5	25.5	30.0	30.33 ± 5.01
3	24.8	17.8	32.0	24.87 ± 7.10
6	22.5	14.8	31.0	22.77 ± 8.10
24	11.8	7.2	6.8	8.60 ± 2.78
36	5.8	3.9	2.2	3.97 ± 1.80
48	3.5	2.85	1.6	2.65 ± 0.97

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ *(in vitro)* ขนาดความเข้มข้นของยา Erythromycin และ Kanamycin ที่ใช้ทดสอบนี้ (ตารางที่ 7 และ 8) จะเตรียมขึ้นให้ใกล้เคียงกับระดับของยาปฏิชีวนะทั้งสองชนิดในซีรั่มปลาคาร์พ ที่วัดได้จากผลการทดลองตามตารางที่ 1-6

ตารางที่ 7 แสดงผลของยา Erythromycin ในซีรั่มที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

ความเข้มข้นของยา	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ที่วัดได้ (mm)			
(μg/ml)	*Streptococcus* spp.	*B. cereus*	*E. coli*	*A. hydrophila*
0.25	-*	-	-	-
0.45	-	-	-	-
0.65	-	-	-	-
0.85	-	7	-	-
1.0	-	8	-	-
1.25	-	10	-	-
1.50	-	11	-	-
1.75	-	11	-	-
2.0	-	12	-	-
2.25	7	13	-	-
2.50	8	14	-	-
2.75	9	14	-	-
3.0	12	15	-	-
3.30	12	15	-	-
ค่ามาตรฐาน**	23	28	-	17
Blank disc***	-	-	-	-

* = ไม่เกิด clear zone

** = disc มาตรฐานมีความเข้มข้นของ Erythromycin 15 μg/ml

*** = disc ควบคุม

ตารางที่ 8 แสดงผลของยา Kanamycin ในซีรั่มที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตข
เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

ความเข้มข้นของยา (μg/ml)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ที่วัดได้ (mm)			
	Streptococcus spp.	*B. cereus*	*E. coli*	*A. hydrophila*
1.0	-*	-	-	-
3.5	-	-	-	-
6.0	-	-	-	7
8.5	-	-	-	8
11.0	-	-	-	11
13.5	7	-	-	12
16.0	7	-	-	14
18.5	8	-	-	15
21.0	10	-	-	15
23.5	10	-	-	15
26.0	10	-	-	13
28.5	11	-	-	13
31.0	12	-	-	15
33.5	12	7	-	15
ค่ามาตรฐาน**	21	16	-	23

* = ไม่เกิด clear zone

** = disc มาตรฐานมีความเข้มข้นของ Kanamycin 30 μg/ml

ตารางที่ 9 แสดงการควบคุมคุณภาพของสารต้านจุลชีพ โดยวิธี Modified Kirby-Bauer Test (NCCLS, 1981)

Antibiotic or Chemotherapeutic agents	Disc potency in μg or units	Zone diameters in mm		
		S. aureus ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*Ps. aeruginosa* ATCC 27853
Amikacin	30	20-26	19-26	18-26
Ampicillin	10	27-35	16-22	-
Carbenicillin	100	-	23-29	18-24
Cephalothin	30	29-37	17-20	-
Chloramphenicol	30	19-26	21-27	-
Clindamycin	2	23-29	-	-
Colistin	10	-	11-15	-
Erythromycin*	15	22-30	8-14	-
Gentamicin	10	19-27	19-26	16-21
Kanamycin*	30	19-26	17-25	-
Nalidixic acid	30	-	23-28	-
Nitrofurantoin	300	20-24	21-26	-
Oxacillin	1	21-26	-	-
Penicillin G	10 U	26-37	-	-
Polymyxin B	300 U	7-13	12-16	-
Streptomycin	10	14-22	12-20	-
Sulfasoxazole	300	19-28	18-25	-
Tetraeycline	30	19-28	18-25	-
Tobramycin	10	19-29	18-26	19-25
Trimethoprim	5	21-28	21-28	-
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	25	24-32	24-32	-

NCCLS = National Committee for Clinical Laboratory Standards

วิจารณ์

ระดับของยาปฏิชีวนะ Erythromycin ที่ฉีดให้ปลาคาร์พในขนาด 5 mg/kg จะพบค่าเฉลี่ยสูงสุดในซีรั่มหลังฉีด 1 ชม. ที่ระดับ 0.96 μg/ml ในขนาด 10 μg/ml ให้ค่าเฉลี่ยที่ระดับ 1.24 μg/ml และในขนาด 15 mg/kg ให้ค่าเฉลี่ยที่ระดับ 2.26 μg/ml แล้วจะลดระดับความเข้มข้นในซีรั่มลงตามระยะเวลาที่ผ่านไปตามลำดับ (ตารางที่ 1, 2 และ 3)

ผลการทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบแบบ *in vitro* พบว่า ระดับความเข้มข้นของ Erythromycin หลังฉีด 1 ชม. มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น โดยขนาด 5 mg/kg สามารถไปยับยั้ง *B. cereus* มีเส้นผ่าศูนย์กลาง clear zone วัดได้ 7 mm ขนาด 10 mg/kg วัด clear zone ได้ 10 mm และขนาด 15 mg/kg มีผลไปยับยั้ง *B. cereus* วัด clear zone ได้ 13 mm และยับยั้ง *Streptococcus* spp. วัดได้ 7 mm (ตารางที่ 7)

นำผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับการตัดสินการใช้ยาปฏิชีวนะ ตามวิธีของ Kirby-Bauer (NCCLS, 1981) ซึ่งการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียใช้ disc มาตรฐาน 15 μg/m (ตารางที่ 9) พบว่า Erythromycin ขนาด 5 mg/kg ไม่สามารถไปยับยั้งการเจริญของเชื้อแกรมบวก และแกร ลบได้เลย ส่วนที่ใช้ขนาด 10 และ 15 mg/kg สามารถไปยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 2592 เท่านั้น โดยระดับของยาในซีรัมไม่มีผลต่อ *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 เล

สำหรับระดับของยาปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ฉีดให้ปลาคาร์พในขนาด 5 mg/kg, 10 mg/kg และ 15 mg/kg ได้ค่าเฉลี่ยสูงสุดในซีรั่มหลังฉีด 1 ชม. ที่ระดับ 12.3 μg/ml, 18.87 μg/ml และ 30.33 μg/ml ตา ลำดับ (ตารางที่ 4, 5 และ 6)

เมื่อนำไปทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ *in vitro* พบว่า ถ้ามีระดับ Kanamycin ในซีรั ปลาคาร์พ ตั้งแต่ 6.0 μg/ml ขึ้นไป จึงจะเริ่มได้ผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ *A. hydrophila* โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลา clear zone ได้ 7 mm และที่ระดับ 13.5 μg/ml จึงเริ่มมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบว *Streptococcus* spp. ซึ่งวัด clear zone ได้ 7 mm เช่นกัน ถ้าหากระดับของ Kanamycin ในซีรั่มปลาคาร์ วัดได้ 31.0 μg/ml จะสามารถไปยับยั้ง *Streptococcus* spp. ที่วัด clear zone ได้ 12 mm และ *A. hydrophil* วัดได้ 15 mm (ตารางที่ 8)

นำผล clear zone ที่วัดได้ของ Kanamycin ไปเปรียบเทียบกับการตัดสินการใช้ปฏิชีวนะตามวิธีข Kirby-Bauer (NCCLS, 1981) ในตารางที่ 9 ที่ใช้ disc มาตรฐาน 30 μg/ml พบว่า Kanamycin ในขนาด 5 mg kg, 10 mg/kg และ 15 mg/kg ไม่สามารถให้ระดับของยาในซีรัมสูงพอที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกร บวก *S. aureus* ATCC 25923 หรือแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 และ *Ps. aeruginosa* ATCC 278

ผลของการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ขนาดของ Erythromycin ที่ 10 และ 15 mg/kg จะให้ความเข้มข้ ในซีรัมพอที่จะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 โดยไม่มีผลต่อ *Ps. aeruginos* ATCC 27853 และ แบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC 25923 ส่วน Kanamycin ที่กำหนดให้ขนาดสูงส ที่ 15 mg/kg ไม่พอเพียงในการรักษาโรคของปลาคาร์พ ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกแล แกรมลบ ถ้าหากต้องใช้ปฏิชีวนะทั้งสองชนิดนี้ในการรักษาแล้ว จำเป็นต้องเพิ่มขนาดให้สูงกว่า โดยไม่ไปก่ ความเป็นพิษต่อปลาคาร์พที่ได้รับการรักษาด้วย อีกทั้งต้องฉีด 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชม. จึงจะมีประสิทธิผ ในการรักษา

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ดังนี้

รองคณบดีฝ่ายวิจัย และคณะกรรมการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายสัตวแพทย์ ประโยชน์ ตันติเจริญยศ นักวิจัย 8 (ผู้ชำนาญการ)

คุณวารุณี พุ่มจันทร์ และ

ศูนย์คอมพิวเตอร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ สายธนู และ โสมทัต วงศ์สว่าง. 2525. โรค Red-Sore ในปลาคาร์พ. วารสารโรคสัตว์น้ำ 5(3): 79-86

ปัญญา โพธิฐิติรัตน์. 2531. โรคปลาสวยงามและการป้องกัน. ใน : เทคนิคการเลี้ยงและการเพาะพันธุ์ปลาสวยงาม. กรุงเทพฯ. หน้า 213-217

Bailly Scott. 1974. Diagnostic Microbiology, 4 th ed. The CV Mosby Company. p 24-25, 65, 138, 143, 323.

Barry A L. 1976. The Antimicrobic Susceptibility Test. In : Principle and Practice. Lea and Febiger, Philadelphia. p 76-83.

Code of Federal Regulation (CFR) 21 1987. Part 300 to 499. U S Government Printing Office. p 271-287.

Hugo W B and Russell A D. 1983. Pharmaceutical Microbiology, 3rd ed. Backwell Scientific Publications, London. p 140-148.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1981. Modified Kirby-Bauer Test. p 107.