5

เตตราซัยคลินในปลาดุกด้าน : เน้นการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ การทดสอบการป้องกันโรค และความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งเชื้อ แอโรโมนาส ไฮโดรฟิลา

นาย ไพรรุ่ง เมฆไตรรัตน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2528

ISBN 974-564-821-3

009576

Tetracycline in Catfish (*Clarias batrachus*) : Emphasis on Pharmacokinetics, Prophylaxis and the Minimal Inhibitory Concentration of Tetracycline to *Aeromonas hydrophila*

Mr. Prairung Mektrairat

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1985

Thesis Title	Tetracycline in Catfish (Clarias batrachus) : Emphasis on Pharmacokinetics, Prophylaxis and the Minimal Inhibitory Concentration of Tetracycline to Aeromonas hydrophila
By	Mr. Prairung Mektrairat
Department	Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.
	Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfilment of the Requirements for the Master's Degree.

S. Bunnag .....Dean of Graduate School

(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

Saree Virunhaphol .....Chairman

(Associate Professor Saree Virunhaphol, M.Sc. in Pharm.)

Santi Thoongsuwan .....Member

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Kriengsag Saitanu .....Member

(Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D.)

Aurapin Yingyong .....Member

(Associate Professor Aurapin Yingyong, M.Sc. in Pharm.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ เตตราซัยคลินในปลาดุกด้าน เน้นการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ การทดสอบการป้องกันโรคและความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งเชื้อ แอโรโมนาส ไฮโดรฟิลา

ชื่อ นาย ไพรรุ่ง เมฆไตรรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ

อาจารย์ นสพ.ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2528

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาเตตราซัยคลินในปลาดุกด้าน เมื่อให้ยาเข้าทางช่องท้อง (5 มก./น้ำหนักตัวปลาดุกด้าน 1 กก.), ทางกล้ามเนื้อด้านข้างลำตัว (5 มก./น้ำหนักตัวปลาดุกด้าน 1 กก.) และทางปาก (50 มก./น้ำหนักตัวปลาดุกด้าน 1 กก.) ใช้วิธีจุลชีววิเคราะห์ในการหาความเข้มข้นของยาในเซรุ่ม, กล้ามเนื้อ, และตับ การหาปริมาณยาในตับและกล้ามเนื้อนั้น ใช้ 0.1 M phosphate buffer, pH 4.5 สะกัดตัวยาออกมาก่อน แล้วจึงให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยวิธีไลโอฟิไลเซชัน (ขบวนการทำให้สารแข็งตัวอย่างรวดเร็วในอุณหภูมิต่ำมาก ๆ แล้วเอาน้ำออกในที่สูญญากาศ) พบว่าค่ากึ่งชีพเฉลี่ยของยาเตตราซัยคลินเป็น 33.10 ± 4.80 ชั่วโมง ในเซรุ่ม และ 33.61 ± 9.54 ชั่วโมงในกล้ามเนื้อ และการดูดซึมของยาเตตราซัยคลิน เมื่อให้ยาเข้าทางช่องท้องดีกว่าการดูดซึมเมื่อให้ยาเข้าทางกล้ามเนื้อและทางปากตามลำดับ

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาเตตราซัยคลินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แอโรโมนาส ไฮโดรฟิลา 57 สายพันธุ์ โดยวิธี Agar dilution techniques พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.51-130.35 mcg/ml สายพันธุ์ที่แยกจากปลาดุก, ปลาช่อน และแหล่งสิ่งแวดล้อม (น้ำ และดินในบ่อเลี้ยงปลา) มีการต้านยาเตตราซัยคลินถึง 50%, 46.42% และ 37.5% ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนและรับจาก Japan Collection of Microorganisms ไม่พบการต้านยาเตตราซัยคลิน

เมื่อให้ยา เตตราซัยคลิน 5 มก./น้ำหนักตัวปลาทุกด้าน 1 กก. เข้าช่องท้องปลาทุกด้าน พบว่า ยา เตตราซัยคลิน สามารถป้องกันการติดเชื้อ Aeromonas hydrophila F181 ได้ 100% ภายใน 3 วัน หลังการให้ยา และการป้องกันจะลดลงเป็น 80%, 0% และ 0% หลังการให้ยา 4 วัน, 6 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับระดับเตตราซัยคลินในกล้ามเนื้อ (ตามทฤษฎี) เมื่อให้ยาเข้าทางช่องท้องปลาทุกด้าน (5 มก./น้ำหนักตัวปลาทุกด้าน 1 กก.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis title Tetracycline in Catfish (Clarias batrachus) : Emphasis on Pharmacokinetics, Prophylaxis and the Minimal Inhibitory Concentration of Tetracycline to Aeromonas hydrophila

Name Mr. Prairung Mektrairat

Thesis advisor Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D.

Department Microbiology

Acadamic Year 1985

Abstract

The pharmacokinetics of tetracycline in catfish (Clarias batrachus) was studied after intraperitoneal administration (5 mg/kg catfish body weight), intramuscular administration (5 mg/kg catfish body weight) and oral administration (50 mg/kg catfish body weight). Microbiological assay was used for determining tetracycline levels in serum, muscle and liver. Lyophilization was applied in concentrating tetracycline, extracted from the tissues (muscle and liver) by 0.1 M phosphate buffer, pH 4.5. The average biological half-lives of tetracycline were 33.10 ± 4.80 h (in serum) and 33.61 ± 9.54 h (in muscle). The tetracycline absorption after the intraperitoneal administration was better than after the intramuscular and oral administration, respectively.

Agar dilution techniques were used for the determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of tetracycline to 57 strains of A. hydrophila. The MICs are varied from 0.51-130.35 mcg/ml. The result from the MIC study shows that A. hydrophila strains isolated from catfish (50.0%), snake-head fish (46.42%) and the enviromental

sources (37.5%) (water and soil in fish culturing ponds) resist to tetracycline, on the other hand, all strains isolated from humans and recieved from Japan Collection of Microorganisms are sensitive.

Tetracycline, 5 mg/kg catfish body weight, administered intraperitoneally, was successfully proved to prevent the A. hydrophila F181 infection in the catfish 100% within 3 days. The protection was decreased to 80%, 0% and 0% at d4, d6 and d7, respectively. Such result corresponds well with the theoretical tetracycline levels in muscle of the catfish after the intraperitoneal administration (5 mg/kg catfish body weight).

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Acknowledgements

I am deeply indebted and grateful to my advisors, Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D. and Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D. for their able quidance, constant interest, criticisms and encouragement throughout the course of this study.

Some parts of this work would have been impossible without the assistance of Associate Professor Piemsak Manasawet, Ph.D., Associate Professor Prasarn Dhamma-Upakorn,Ph.D., Associate Professor Aurapin Yingyong, M.Sc. in Pharm., Instructor Somboon Tanasuppawat, M.Sc. (Microbiology), Associate Professor Sommatat Wongsawang, Ph.D., Assistant Professor Jeerasak Tangtrongpiroj, Ph.D., Associate Professor Kriengsak Poonsook, D.V.M., Jurairutana Rongrodgianarug, B. Pharm. and Instructor Wongcare Tivatadavirute, M.Sc. in Pharm.

Particular thank is given to Wongwiwat Tassaneeyakul, M.Sc. (Pharmacology) and Sanguansit Nicrowatanayingyong, B. Pharm. for their valuable suggestions in writing this thesis.

I do not forget the assistance of Kunnikar Teerapattanakiat, B.Sc; Wanna Vorrapiboonsak, B.Sc., Prasarn Tongsing, Kingfah Thupmonchai, M.Sc. (Pharmacy), Suporn Jarumanee,M.Sc. (Pharmacy), Rathanee Rotwirot,M.Sc. (Pharmacy), Peerapan Krutwacho, B.Ed., Prinya Chomvonges, B.Sc., and Vitoon Kaewtrirat. I wish to express my sincere thank to all of them.

I also wish to express my sincere thanks to all the staff of the Department of Microbiology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Division of Microbiology, the Faculty of Veterinary Sciences and the Scientific and Technological Research Equipment Center, Chulalongkorn University, for their cooperation and assistance.

I wish to give special acknowledgement to the scientists and researchers of various works whose names are listed in the part of references who have given me ideas for this work.

My sincere thanks are extended to all of those whose names have not been mentioned helping me in direct ways or indirect ways to make this work a reality.

Finally, this study was partly supported by a grant of the graduate School, Chulalongkorn University, which is gratefully acknowleged.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai)..... iv

ABSTRACT (English)..... vi

ACKNOWLEDGEMENTS..... viii

TABLES..... xi

FIGURES..... xiii

ABBREVIATIONS..... xv

CHAPTER

1. Introduction..... 1

2. Materials and Methods..... 36

3. Results..... 49

4. Discussion and Conclusion..... 82

REFERENCES..... 94

APPENDIX I..... 103

APPENDIX II..... 107

VITA..... 112

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLES

Tables		Page
1.	Differentiation between A. hydrophila, A. caviae, A. sobria and A. salmonicida.....	23
2.	Other characteristics of motile Aeromonas species (species 1-3) and Aeromonas salmonicida	25
3.	Reaction of enteric bacteria in AH medium.....	30
4.	Tetracycline HCl added in muscle & liver.....	42
5.	% recoveries of tetracycline in muscle and liver....	52
6.	Drug levels of tetracycline in serum, muscle and liver in cat-fish after the intraperitoneal administration	54
7.	Drug levels of tetracycline in serum, muscle and liver in catfish after the intramuscular administration...	60
8.	Drug levels of tetracycline in serum, muscle and liver in catfish after the oral administration.....	66
9.	The biological half-lives ($t_{\frac{1}{2}}$) and AUC_0^{∞} mcg.h/ml or gm after the IP, IM and the oral administration....	71
10.	The Minimal Inhibitory Concentration of tetracycline HCl t0 57 strains of A. hydrophila	75

Tables Page

11. The resistant A. hydrophila strains derived from the interpretation of disc susceptibility test (A resistant strain: has ⩾ 12 mcg/ml tetracycline MIC) 78

12. The prophylaxis testing of tetracycline against A. hydrophila in catfish (Clarias batrachus)..... 80

13. The determination of the AUC_0^{α} of tetracycline in muscle (mcg.h/gm) after the intraperitoneal administration... 111

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FIGURES

Figures		Page
1.	Structure of Tetracyclines.....	4
2.	The standard curves of tetracycline.....	50
3.	The tetracycline levels (mean ± S.D.) in serum after the intraperitoneal administration.....	55
4.	The tetracycline levels (mean ± S.D.) in muscle after the intraperitoneal administration.....	56
5.	The tetracycline levels (mean ± S.D.) in liver after the intraperitoneal administration.....	57
6.	The tetracycline levels (mean ± S.D.) in serum, muscle and liver after the intraperitoneal administration.....	58
7.	The tetracycline levels (mean ± S.D.) in serum after the intramuscular administration.....	61
8.	The tetracycline levels (mean ± S.D.) in muscle after the intramuscular administration.....	62
9.	The tetracycline levels (mean ± S.D.) in liver after the intramuscular administration.....	63
10.	The tetracycline levels (means ± S.D.) in serum, muscle and liver after the intramuscular administration.....	64

Figures Page

11. The tetracycline levels (mean ± S.D.) in serum after the oral administration..... 67

12. The tetracycline levels (mean ± S.D.) in muscle after the oral administration..... 68

13. The tetracycline levels (means ± S.D.) in liver after the oral administration..... 69

14. The tetracycline levels (mean ± S.D.) in serum, muscle and liver after the oral asministration... 70

15. The tetracycline levels (mean ± S.D.) in serum and muscle after the intraperitoneal administration, and the percentage of protection of the catfish to A. hydrophila F 181 infection..... 81

16. The tetracycline levels in muscle after the intraperitoneal administration and the established linear regression line (C) (from 24 h to 144 h)..... 109

17. The determination of the area, D of tetracycline levels in muscle after the intraperitoneal administration..... 110

Abbreviations

AUC_o^α	=	area under the concentration-time curve from time zero to infinity
^oC	=	degree celcius
cm	=	centimeter
d	=	day
eg.	=	for example
gm	=	gram
h	=	hour
I.M.	=	intramuscular
I.P.	=	intraperitoneal
IU	=	international unit
I.V.	=	intravenous
JCM	=	Japan Collection of Micro-organisms
kg	=	kilogram
l	=	liter
lb	=	pound
μ	=	micron
M	=	molar
mcg	=	microgram
μl	=	microliter
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
MIC	=	Minimal Inhibitory Concentration
min	=	minute
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
rpm	=	round per minute
- ve	=	negative
+ ve	=	positive

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย