



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชและพิษวิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

เภสัชและพิษวิทยาทางสัตวแพทย์

เภสัชวิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกปัดแคลเซียมซัลเฟตให้เหมาะสม

Optimized Elution of Cefazolin from Calcium Sulfate Beads

นามผู้วิจัย นางสาวรวงคณา กังวานสุขพันธ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปาริยา อุดมกุศลศรี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐสิทธิ์ ดันสกุล, Dr.med.vet.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กาญจนา อิ่มศิลป์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กาญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกปัดแคลเซียมซัลเฟตที่เหมาะสม

Optimized Elution of Cefazolin from Calcium Sulfate Beads

โดย

นางสาวรวงคณา กังวานสุขพันธ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชและพิษวิทยาทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วารางคณา กังวานสุขพันธ์ 2556: การปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดเคลือบเคลือบให้เหมาะสม
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชและพิษวิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาเภสัชและพิษวิทยาทาง
สัตวแพทย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ปรีชา อุดมกุศลศรี, Ph.D. 91 หน้า

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดเคลือบเคลือบให้เหมาะสม
และลูกบิดโพลีเมทิลเมทาไครเลต (PMMA) ที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการ
เตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะ (antibiotic bead) แบ่งเป็น 5 กลุ่มคือ ลูกบิดเซฟฟาโซลิน-เคลือบเคลือบที่มีปริมาณยา
0.25, 0.5 และ 1 กรัมและลูกบิดเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยา 1 และ 2 กรัมตามลำดับ ลูกบิดจำนวน
10 เม็ดในแต่ละกลุ่มโดยแบ่งใส่หลอดเก็บตัวอย่างหลอดละ 2 เม็ด จะถูกเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูลทุกวัน
จนครบ 8 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ ผลการทดลองพบว่า ลูกบิดเซฟฟาโซลิน-เคลือบเคลือบสามารถ
ปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้สูงกว่ากลุ่มลูกบิดเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติที่มีนัยสำคัญ
ทางสถิติ 0.05 และนำไปทดสอบหาค่า MIC ของความเข้มข้นของยาเซฟฟาโซลินพบว่า มีระดับสูงกว่าค่าการ
ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต่ำสุดโดยใช้เชื้อ *S. aureus* (ATCC 25923, TISTR 517) คือ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร
และในการศึกษาของกลุ่มลูกบิดเซฟฟาโซลิน-เคลือบเคลือบพบว่า กลุ่มที่มีปริมาณยา 1 กรัมจะปลดปล่อยได้
ปริมาณยาสูงกว่ากลุ่มที่มีปริมาณยา 0.5 และ 0.25 กรัมตามลำดับ ส่วนลูกบิดเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอพบว่า
กลุ่มที่มีปริมาณยา 2 กรัมปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้ในปริมาณสูงกว่ากลุ่มที่มีปริมาณยา 1 กรัมและจากการศึกษา
แสดงให้เห็นว่า กลุ่มลูกบิดเซฟฟาโซลิน-เคลือบเคลือบและกลุ่มลูกบิดเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอมีผลสำหรับ
การรักษาและการติดเชื้อแบคทีเรียได้เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

ผลการทดลองจากการศึกษาผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บสปอร์ของ *B. subtilis* (ATCC
6633, TISTR 008) อย่างต่อเนื่อง 12 เดือนต่อประสิทธิภาพในการตรวจยาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพด้วยวิธี
วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาโดยแบ่งเก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียส สำหรับ
ใช้ในการทดสอบกับยาเอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin) ที่มีความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 พีเอ็มเอ็ม
และยาเจนดามัยซิน (gentamicin) ที่มีความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10.0 พีเอ็มเอ็มนำถาดที่ได้บ่มที่ 37 องศา
เซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมงและวัดค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r^2) ในแต่ละเดือนแต่ละกลุ่มนั้นมีปัจจัยสำคัญ
คือ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์ของ *B. subtilis* มีผลทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05
ดังนั้นระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์ของ *B. subtilis* มีผลโดยการตรวจด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
และพบว่า ในเดือนที่ 8 สปอร์ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สปอร์มีความเนิ่นละเอียดยมากกว่าอุณหภูมิห้อง
(25-30 องศาเซลเซียส) จึงเป็นแนวทางในการตรวจยาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Warangkana Kangwansupapan 2013: Optimized Elution of Cefazolin from Calcium Sulfate Beads. Master of Science (Veterinary Pharmacology and Toxicology), Major Field: Veterinary Pharmacology and Toxicology, Department of Pharmacology. Thesis Advisor: Assistant Professor Pareeya Udomkunsri, Ph.D. 91 pages.

The present study was aimed to the cefazolin elution from the calcium sulfate beads and polymethylmethacrylate (PMMA) beads which prepared from different concentrations of cefazolin. The calcium beads were made by mixing 0.25, 0.5 or 1g cefazolin injection formulation and 10 g calcium sulfate. For PMMA beads, 1 or 2 g cefazolin were mixed with 10 g of PMMA. The beads were placed in phosphate buffer saline and daily eluted cefazolin concentrations were determined by microbioassay for 8 days of experimental period. It was shown that cefazolin-calcium sulfate beads released higher amounts of antibiotic than cefazolin-PMMA beads significantly ($P < 0.05$). In addition, the eluted cefazolin concentrations were higher than the minimal inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, TISTR 517). The study showed the released cefazolin concentrations from 1g cefazolin-calcium sulfate beads was higher than 0.5 and 0.25 g cefazolin-calcium sulfate beads. The released cefazolin from 2g cefazolin-PMMA bead was higher than 1g cefazolin-PMMA bead. This study showed that cefazolin-calcium sulfate and cefazolin-PMMA beads were effective for treatment of local bacterial infection.

Microbioassay is used to determine the activities of antimicrobial agents by the response of the indicator organism. We studied the storage effects of *Bacillus subtilis* (ATCC 6633, TISTR 008) spore on the determination of antimicrobial concentrations by microbioassay method. The spores of *B. subtilis* were kept at 4 °C and room temperature (25-30°C). *B. subtilis* spores were seeded on Mueller Hinton agar and Antibiotic Medium 5 agar. The *B. subtilis* seeded agar plates were tested with enrofloxacin (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 ppm) and gentamicin (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 ppm). Plates were incubated at 37 °C for 18-20 hr and diameters of inhibition zones were measured. The tests were repeated every month for 12 months. The antimicrobial concentrations versus inhibition zones were plotted as standard curves. The correlation coefficient (r^2) were calculated and used to compare the effects of spore storage. The r^2 of standard curve for each month and each group were statistical significant difference. Moreover, the storage temperature were effected on *B. subtilis* spore growth ($P < 0.05$). It is concluded that both times and storage temperature were influent on *B. subtilis* spore growth on microbioassay.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาริยา อุดมกุศลศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และให้กำลังใจในการทำงานวิจัย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติวรรณ เพ็ญเพียร ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลทางสถิติ และขอขอบคุณคุณคุณนสกร เผ่าชูศักดิ์ นักวิทยาศาสตร์ภาคเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คอยช่วยเหลือจัดหาเครื่องมืออุปกรณ์วิทยาศาสตร์ คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อไพฑูรย์-คุณแม่อัญญาณี กังวานสุขพันธ์ น้องสาวของข้าพเจ้า และเพื่อนๆ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งเสมอมา ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วรารคณา กังวานสุขพันธ์
กุมภาพันธ์ 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และตัวย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	23
อุปกรณ์	23
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	32
ผล	32
วิจารณ์	43
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
สรุป	51
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	61
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	91

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขั้นตอนในการเตรียมสปอร์ของเชื้อ <i>B. subtilis</i> เพื่อใช้ในการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา	29
2	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Average) ของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน ($\mu\text{g/ml}$) ที่ปลดปล่อยจากลูกบิดยาปฏิชีวนะระหว่างกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต (1:10) กับกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอ (1:10) ในระยะเวลา 8 วัน	35
3	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Average) ของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน ($\mu\text{g/ml}$) ที่ปลดปล่อยจากกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตและกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกัน ในระยะเวลา 8 วัน	37
4	ผลรวมสะสมของการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากกลุ่มลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตและกลุ่มลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกัน	39
5	ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ของเส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินโดยใช้สปอร์ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)	42
6	ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ของเส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินโดยใช้สปอร์ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)	43
 ตารางผนวกที่		
1	การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (Phosphate Buffer Saline) (0.1 MPBS, pH 7.4)	65
2	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) (Difco)	90
3	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Antibiotic medium 5 agar (Difco)	90
4	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) (Difco)	90

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โพลีเมทิลเมทาไครเลต (Polymethylmethacrylate, PMMA) และสารละลาย โมโนเมอร์ (Monomer)(Acrylic Simplex rapid, Kemdent)7	7
2	แคลเซียมซัลเฟต เฮมิไฮเดรต (Calcium sulfate hemihydrate)	8
3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาเซฟฟาโซลิน	10
4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาเอนโรฟลอกซาซิน	13
5	สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาเจนด้ามัยซิน	14
6	การทดสอบความไวของเชื้อ	17
7	เครื่องตรวจหาความเข้มข้นระดับของยาหรือสารต้านจุลชีพ	18
8	เชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i>	19
9	เชื้อ <i>S. aerues</i>	20
10	การห่อหุ้มปิดยาปฏิชีวนะ โดยใช้แบบหล่อซิลิโคน	25
11	ลูกบิดยาปฏิชีวนะ	26
12	ผลการทดสอบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตโดยใช้ วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาโดยแต่ละถาดความเข้มข้นยาแตกต่างกันคือ ถาดที่1 กลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต (0.25:10)ถาดที่ 2 กลุ่มของ ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต (0.5:10) และถาดที่ 3 กลุ่มของลูกบิดยา เซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต (1:10) (จากซ้ายไปขวา)	35
13	แสดงค่าเฉลี่ย (Average) ของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน ($\mu\text{g/ml}$) ที่ปลดปล่อยจาก ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต (1:10) และกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซ ลิน-พีเอ็มเอ็มเอ (1:10) ในระยะเวลา 8 วันและค่า MIC สำหรับ <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (TISTR 517) คือ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)	36
14	แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน($\mu\text{g/ml}$)ที่ปลดปล่อยจากลูกบิด แคลเซียมซัลเฟตและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกัน และค่า MIC สำหรับ <i>S.aureus</i> (TISTR 517) คือ 0.125 $\mu\text{g/ml}$	38
15	แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน($\mu\text{g/ml}$)ที่ปลดปล่อยจากลูกบิด แคลเซียมซัลเฟตและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกัน	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	แสดงค่าปริมาณยา (mg/bead) ที่ปลดปล่อยจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกันทั้ง 5 ชั่วโมง	39
17	แสดงค่าปริมาณยา(mg/bead)ที่ปลดปล่อยจากลูกบิดพีอีเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกันทั้ง 5 ชั่วโมง	40
18	การตรวจโดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของยาเอนโรฟลอกซาซินโดยใช้สปอร์ของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> (TISTR 008) ที่เก็บนาน 8 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ซ้าย) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) (ขวา)	41
ภาพผนวกที่		
1	การเปรียบเทียบโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียระหว่างแกรมบวก (Positive) และแกรมลบ (Negative)	62
2	ลักษณะของลูกบิดยาปฏิชีวนะอยู่ในแบบหล่อเมื่อแห้ง	62
3	แบบจำลองการทดสอบ MIC ใน 96 well plate	63
4	การทดสอบ MIC ของยาเซฟฟาโซลิน (cefazolin) กับยาเซฟตาซิม (ceftazidime) ใน 96 well plate	63
5	การเปรียบเทียบค่าเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อของลูกบิดยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่างกันจากถาดซ้ายมีความเข้มข้นน้อยสุดไปหาถาดขวามีความเข้มข้นมากที่สุด	64
6	ผลการทดลองการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต	64
7	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 1	66
8	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 2	67
9	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 3	68
10	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 4	69
11	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 5	70
12	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 6	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
13	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 7
14	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 8
15	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 9
16	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 10
17	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 11
18	เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 12
19	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 1
20	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 2
21	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 3
22	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 4
23	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 5
24	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 6
25	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 7
26	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 8
27	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 9
28	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 10
29	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 11
30	เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 12

คำอธิบายสัญลักษณ์และตัวย่อ

ตัวย่อ	คำอธิบาย
PMMA	Polymethylmethacrylate
g	gram
MIC _s	Minimal Inhibitory Concentrations
ml	milliliter
PBS	Phosphate buffer saline
pH	power of Hydrogen ion
h	hour
°C	degree Celsius
μg	microgram
MHA	Mueller Hinton agar
ppm	part per million
r ²	Correlation coefficient
HPLC	high performance liquid chromatography
RIA	radioenzymatic assay
EMIT	enzyme multiplied immunoassay technique
O.D.	Optical density
nm	nanometer
mm	millimeter
CaSO ₄	calcium sulfate
ABLC	antibiotic-loaded bone cement
UV	Ultraviolet
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
microbioassay	microbiological assay
PBPs	penicillin-binding proteins

คำอธิบายสัญลักษณ์และตัวย่อ (ต่อ)

ตัวย่อ

คำอธิบาย

TSA	tryptic soy agar
TSB	tryptic soy broth
MMA	methylmethacrylate
MRSA	methicillin-resistant <i>S. aureus</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
gm	gram
M	mole
MW	molecular weight

การปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกปัดแคลเซียมซัลเฟตที่เหมาะสม

Optimized Elution of Cefazolin from Calcium Sulfate Beads

คำนำ

เมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียเฉพาะที่ในสัตว์เลี้ยงในการรักษาทั่วไบนั้นเป็นการให้ยาปฏิชีวนะทางระบบเช่นให้ยาโดยการฉีดหรือกินซึ่งยาปฏิชีวนะบางชนิดอาจจะก่อให้เกิดผลกระทบข้างเคียงต่อร่างกายสัตว์เลี้ยง เช่น การเกิดความเป็นพิษต่อตับและไต อีกทั้งยาปฏิชีวนะไม่สามารถเข้าถึงเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียในระดับที่สูงเพียงพอและนานพอที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ทั้งนี้เนื่องจากมีปัจจัยทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ของยา (pharmacokinetics) ได้แก่การแพร่กระจายของยา, การดูดซึมของยา, การเปลี่ยนแปลงของยาและการขับออกของยาประกอบกับการอักเสบที่อาจเกิดร่วมกับการติดเชื้อ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้การรักษาทางระบบให้ผลได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงได้มีการนำเทคนิคและวิธีการใหม่ๆ เข้ามาใช้ในทางสัตวแพทย์ โดยใช้วิธีการรักษาการติดเชื้อให้จำกัดในบริเวณที่เกิดการติดเชื้อเพื่อช่วยให้การรักษาสัตว์เลี้ยงมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เช่นการนำเอาวัสดุทางการแพทย์ที่ใช้ในมนุษย์มาประยุกต์ใช้ในการรักษาสัตว์ผสมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อทำเป็นเม็ดลูกปัดยาปฏิชีวนะ (antibiotic beads) (Orsini *et al.*, 2004; Ueng *et al.*, 2002) การรักษาการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อและกระดูก รวมถึงรักษาแผลและฝีที่กระดูกและอวัยวะของกระดูก วัสดุทางการแพทย์ที่นำมาใช้มีหลายประเภทอาทิเช่น ซีเมนต์กระดูก (bone cement) (Diefenbeck *et al.*, 2006; Holman *et al.*, 1999; McKellar *et al.*, 1999; Stone *et al.*, 2006), block, disc, sponge และ patch เป็นต้น ทั้งหมดนี้อาศัยหลักการนำยาปฏิชีวนะเข้าไปผสมกับเนื้อวัสดุ โดยหลักการให้ยาในลักษณะนี้เป็นการให้ยาแบบเฉพาะที่ (local administration) มีจุดประสงค์เพื่อให้ระดับยามีปริมาณสูงเพียงพอและนานพอที่จะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยการนำลูกปัดยาปฏิชีวนะไปฝังในบริเวณที่มีการติดเชื้อที่เนื้อเยื่อและกระดูกจากนั้นตัวยาปฏิชีวนะในลูกปัดจะค่อยๆแพร่กระจายและดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ ดังนั้นการปลดปล่อยยาจากลูกปัดยาปฏิชีวนะเข้าสู่เนื้อเยื่อจะเป็นไปอย่างต่อเนื่องในระยะเวลาที่สามารถควบคุมการติดเชื้อได้ในระยะเวลาที่เหมาะสมและความเข้มข้นของยาควรมีระดับความเข้มข้นสูงกว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

สำหรับการทดลองครั้งนี้ใช้ยาปฏิชีวนะเซฟฟาโซลิน (cefazolin) ผสมกับวัสดุทางการแพทย์ 2 ชนิด คือ โพลีเมทิลเมทาไครเลต (polymethylmethacrylate, PMMA) และแคลเซียมซัลเฟต (calcium sulfate, CaSO_4) และยาเซฟฟาโซลินที่เลือกใช้เป็นยาชนิดผงสำหรับฉีดแทนยาเซฟฟาโซลินชนิดบริสุทธ์ซึ่งจะมีราคาแพง และศึกษาการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นยาแตกต่างกัน ซึ่งมีรายงานผลการวิจัยพบว่า การนำตัวยาเซฟฟาโซลินผสมกับโพลีเมทิลเมทาไครเลตหรือแคลเซียมซัลเฟตสามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกมาได้เป็นอย่างดี (Wang *et al.*, 2004; Udomkusonsri *et al.*, 2012)

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาวัตถุประสงค์ของการยับยั้งเชื้อของยาเซฟฟาโซลินที่ปลดปล่อยจากลูกบิดยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbioassay) ซึ่งวิธีการทดสอบทางจุลชีววิทยาใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบ และได้ทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บและอุณหภูมิในการเก็บเชื้อ *B. subtilis* ในรูปสปอร์ (spore) ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 ปีโดยแบ่งเก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ซึ่งใช้ยาปฏิชีวนะมาตรฐาน 2 ชนิดคือ ยาเอนโรฟลอกซาซินและยาเจนด้ามัยซิน ในการทดสอบเพื่อหาวิธีเก็บรักษาสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ที่เหมาะสมในการทดสอบทางจุลชีววิทยา

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดเคลือบเคลือบเซรามิคและลูกบิดพีอีเอ็มเอ็มเอที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นยาแตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บสปอร์เชื้อ *B. subtilis* อย่างต่อเนื่อง 12 เดือนต่อประสิทธิภาพในการตรวจยาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ขอบเขตการวิจัย

1. ใช้ยาเซฟฟาโซลินผสมกับเคลือบเซรามิคและพีอีเอ็มเอ็มเอเพื่อเตรียมเป็นลูกบิดยาปฏิชีวนะ
 - 1.1 ลูกบิดเคลือบเซรามิค: ใช้ยาเซฟฟาโซลินชนิดผงสำหรับฉีดที่มีความเข้มข้นของยาที่แตกต่างกัน
 - 1.2 ลูกบิดพีอีเอ็มเอ็มเอ: ใช้ยาเซฟฟาโซลินชนิดผงสำหรับฉีดที่มีความเข้มข้นของยาที่แตกต่างกัน
2. วัดระดับของยาเซฟฟาโซลินที่ปลดปล่อย (antibiotic elution) จากลูกบิดเคลือบเซรามิคและลูกบิดพีอีเอ็มเอ็มเอที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นยาแตกต่างกัน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbioassay) ซึ่งใช้แบบการนำยาปฏิชีวนะหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีจุลชีพ
3. เปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกจากลูกบิดเคลือบเซรามิคและลูกบิดพีอีเอ็มเอ็มเอที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีปริมาณยาเท่ากัน
4. เตรียมสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* (ATCC 6633 หรือ TISTR 008) ให้ได้ปริมาณมากพอที่ใช้ในการทดสอบต่อเนื่อง 12 เดือน
5. เก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และที่ 4 องศาเซลเซียส

6. ทดสอบสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ที่เตรียมจากข้างข้อ 4. โดยใช้ยาเอนโรฟลอกซาซินและเจนด้ามัยซินทุกเดือนต่อเนื่อง 12 เดือน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbioassay) ซึ่งใช้แบบการนำยาปฏิชีวนะหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีจุลชีพ

7. วัดเขตของการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ของยาต้านจุลชีพ เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บสปอร์ต่อประสิทธิภาพในการตรวจยาปฏิชีวนะ



การตรวจเอกสาร

ลูกบิดยาปฏิชีวนะ

ลูกบิดยาปฏิชีวนะ (Antibiotic bead) ได้จากการนำยาปฏิชีวนะผสมกับวัสดุทางการแพทย์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมตามการใช้ในการรักษาการติดเชื้อและป้องกันการติดเชื้อที่บริเวณแผลและกระดูก ในการทำลูกบิดยาปฏิชีวนะสามารถเตรียมได้จากวัสดุหลายรูปแบบ โดยวัสดุทางการแพทย์ที่นิยมนำมาใช้เตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะมีหลากหลายชนิด เช่น แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) (Sasaki *et al.*, 2005), แคลเซียมซัลเฟต (calcium sulfate) (Rauschmanna *et al.*, 2005; Sanicola and Albert, 2005; Santschi and McGarvey, 2003), ไคโตซาน (chitosan) (Adrino *et al.*, 2005; Anal and Stevens, 2005), โพลีเมทิลเมทาไครเลต (polymethylmethacrylate, PMMA) (Revell *et al.*, 1998) และไฮดรอกซีแอพาไทต์ (hydroxyapatite ceramic) (Wininger and Fass, 1996) เป็นต้น ซึ่งในแต่ละงานวิจัยจะใช้วัสดุทางการแพทย์ที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ลูกบิดยาปฏิชีวนะยังมีชื่อเรียกที่ต่างกันไป เช่น antibiotic-loaded bone cement (ABLC), antibiotic – impregnated beads, antibiotic – impregnated cements เป็นต้น โดยการนำไปใช้ในการรักษาการติดเชื้อเฉพาะที่ ยาปฏิชีวนะนั้นได้รับความสนใจเนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการป้องกันและรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียทางศัลยกรรมศาสตร์

ตั้งแต่ในปี 1930 เริ่มมีการใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป็นครั้งแรก โดยการให้ยาที่มีความเข้มข้นสูงใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อเทียบกับการรักษาแบบทั่วไปเป็นการรักษาทางระบบ พบว่า สามารถหลีกเลี่ยงความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาและการเกิดอาการแพ้ยาอย่างรุนแรง อีกทั้ง Buchholz and Engelbrecht (1970) รายงานว่าในปี 1970 ได้มีการริเริ่มใช้ gentamicin-loaded polymethylmethacrylate-cement (gentamicin-loaded PMMA-cement) ในการรักษาการติดเชื้อจากการทำศัลยกรรมข้อต่อและเป็นวิธีการรักษาที่แพร่หลายต่อมาในการป้องกันรักษาโรคกระดูกและการติดเชื้อร่วมกันในกรณีที่มีการใช้รักษากับกระดูกนั้นวิธีการนี้เป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมากและ Klemm (1979) รายงานว่า ในปี 1979 มีการนำเอา antibiotic – impregnated PMMA beads ซึ่งนำมาใช้ในการรักษาโรคทางกระดูกทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังเนื่องจากลูกบิดยาปฏิชีวนะนั้นได้ถูกมีการนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อเฉพาะที่ โดยเฉพาะกรณีที่มีการติดเชื้อที่บริเวณกระดูกและรักษาการติดเชื้อบริเวณที่มีการฝังเครื่องมือทางการแพทย์ เช่น surgical implant และ ventricular assist device เป็นต้น (Holman *et al.*, 1999; McKellar *et al.*, 1999; Zilberman and Elsner, 2008)

การเตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะ

การเตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะเป็นการนำยาปฏิชีวนะผสมกับวัสดุทางการแพทย์ โดยวัสดุที่นิยมใช้คือ ซีเมนต์กระดูก (bone cement) เป็นวัสดุที่ใช้เติมเต็มโพรงกระดูกเพื่อให้ตรงตามตำแหน่งที่ต้องการและไม่มีการเคลื่อนไหวการยึดติดระหว่างซีเมนต์กับกระดูกหรือซีเมนต์กับข้อเทียมเป็นการยึดติดแบบทางกลซึ่งเกิดจากการไหลตัวของซีเมนต์กระดูกเข้าไปยังรูพรุนต่าง ๆ ของกระดูกและโลหะที่เป็นข้อเทียมมีองค์ประกอบเป็นโพลิเมอร์เกิดจากการนำโมโนเมอร์ของเมทิลเมทาไครเลต (methylmethacrylate, MMA) มาทำกระบวนการเกิดโพลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) โดยนักเคมีชาวเยอรมัน 2 คนคือ ฟิททิจและพอล สามารถสังเคราะห์โพลิเมทิลเมทาไครเลต (polymethylmethacrylate, PMMA) ได้ตั้งแต่ปี 1877 จากนั้นได้มีการพัฒนาเรื่อยมาจนถึงปัจจุบันโพลิเมทิลเมทาไครเลตหรือพีเอ็มเอ็มเอจัดเป็นโพลิเมอร์ในกลุ่มของเทอร์โมพลาสติก (Thermoplastic) ที่เป็นผงหรือความเป็นอสัณฐาน (amorphous) ของโพลิเมอร์ จึงทำให้มีคุณสมบัติเด่นคือ แข็งและเหนียวสามารถขึ้นรูปได้ง่าย และได้มีการนำพีเอ็มเอ็มเอมาประยุกต์ใช้งานด้านทันตกรรมอย่างกว้างขวาง ทั้งในรูปแบบที่เป็นแบบผงพีเอ็มเอ็มเอนอกจากนั้นได้มีการนำพีเอ็มเอ็มเอมาผสมกับยาปฏิชีวนะสำหรับใช้ทำลูกบิดยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้ในการแก้ปัญหาฟันที่บริเวณโพรงฟันกระต่ายและนำมาใช้ในการรักษาโรคกระดูกของสัตว์แพทย์ โดยยาปฏิชีวนะที่ถูกผสมกับวัสดุพีเอ็มเอ็มเอ จะทำการผ่าตัดฝังไว้ภายในบริเวณโพรงกระดูกที่มีการติดเชื้อ ซึ่งลูกบิดยาปฏิชีวนะที่ฝังไว้สามารถที่จะฆ่าเชื้อและรักษาบริเวณพื้นที่ที่เกิดการติดเชื้อในกระดูก (Adams *et al.*, 1992; Mader *et al.*, 1997) โดยทั่วไปนั้นการรักษาฝีดังกล่าวนิยมใช้ลูกบิดยาปฏิชีวนะร่วมกับการให้ยาปฏิชีวนะทางระบบเช่นการให้ลูกบิดยาปฏิชีวนะที่เตรียมจากพีเอ็มเอ็มเอผสมกับเจนด้ามยจีนและใช้ยาในกลุ่มเซฟาโลสปอรินรักษาทางระบบ (Harcourt-Brown., 2002) ข้อดีของการใช้ลูกบิดยาปฏิชีวนะมีหลายประการ คือลูกบิดยาปฏิชีวนะสามารถปลดปล่อยยาปฏิชีวนะจากลูกบิดได้ในปริมาณความเข้มข้นสูงพอที่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ส่งผลทำให้ช่วยลดการนำไปสู่อาการอักเสบและความเป็นพิษต่อระบบภายในร่างกายซึ่งอาจจะทำให้เกิดผลร้ายตามมา (Mader *et al.*, 1997) รวมทั้งยังสามารถลดระยะเวลาการรักษาในโรงพยาบาลและค่าใช้จ่ายการรักษาได้อีกด้วย

นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการในการนำพีเอ็มเอ็มเอมาใช้งานเนื่องจากเป็นวัสดุที่นำมาใช้ในการทำลูกบิดยาปฏิชีวนะไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงจำเป็นต้องทำการผ่าตัดครั้งที่สองหลังการรักษาเสร็จสิ้นเพื่อนำพีเอ็มเอ็มเอออกจากร่างกาย (Patzakis *et al.*, 1993) และพีเอ็มเอ็มเอจะคายความร้อน (exothermic reaction) ออกมาในขณะขึ้นรูป (polymerization) ทำให้การใช้พีเอ็มเอ็มเอเป็นวัสดุในการทำเม็ดลูกบิดยาปฏิชีวนะจึงมีข้อจำกัดในเรื่องของการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะ (Harcourt,

2002) ที่ผ่านมามีการนำพีเอ็มเอ็มเอมาทดสอบหลากหลายรูปแบบ เช่น การตรวจสอบเนื้อเยื่อ และกระดูกในสุนัขเพื่อทดสอบประสิทธิภาพ โดยใช้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ ซึ่งยาปฏิชีวนะที่นิยมนำมาใช้ เช่น เชฟฟาโซลิน (cefazolin), ไซโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin), โทบรามัยซิน (tobramycin) และ แวนโคมัยซิน (vancomycin) ผสมกับพีเอ็มเอ็มเอและความเข้มข้นสูงกว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) (Adams, 1992) นอกจากนี้ความเข้มข้นของโทบรามัยซินและแวนโคมัยซินที่ใช้ในการรักษากระดูกดังกล่าวข้างต้นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อได้ และสามารถปล่อยยาปฏิชีวนะจากลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอได้อย่างเพียงพอในการรักษา (Rushton, 1997; Willson, 1988) ยาปฏิชีวนะที่เตรียมจากวัสดุพีเอ็มเอ็มเอเป็นประโยชน์ที่จะช่วยลดความเป็นพิษต่อระบบ อาจจะมีผลเสียในการรักษากระดูกและการฟื้นฟูของร่างกายและมีการศึกษาในหลอดทดลองโดยการตรวจสอบผลของการใช้ปริมาณความเข้มข้นที่สูงของเจนตามัยซิน (gentamicin), โทบรามัยซิน, เชฟฟาโซลิน และแวนโคมัยซินอย่างสม่ำเสมอ

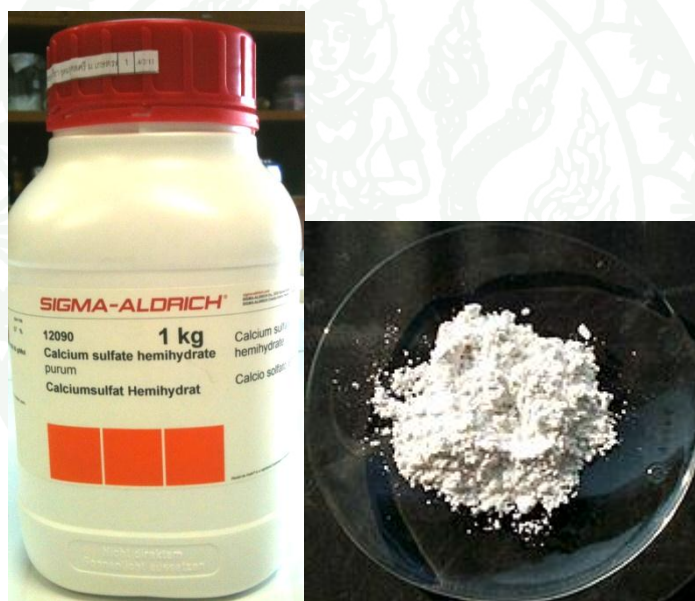


ภาพที่ 1 โพลีเมทิลเมทาไครเลต (Polymethylmethacrylate, PMMA) และสารละลายโมโนเมอร์ (Monomer)(Acrylic Simplex rapid, Kemdent)

นอกจากนี้ยังมีการนำเอาวัสดุอื่นเข้ามาใช้ผสมยาปฏิชีวนะเพื่อทำเป็นลูกบิดยาปฏิชีวนะ คือ แคลเซียมซัลเฟต (Calcium sulfate) มีสูตรทางเคมีคือ CaSO_4 เป็นสารเคมีที่ใช้ในห้องทดลองและงานพวกอุตสาหกรรม ซึ่งอยู่ในรูปแอนไฮดรัส (anhydrous) เป็นของแข็งโดยมีส่วนประกอบคือ แคลเซียม

ซัลเฟต เฮมิไฮเดรต (calcium sulfate hemihydrate) มีสูตรทางเคมี $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ หรือเรียกว่า ปลาสเตอร์ออฟปารีส (plaster of paris) โดยมีลักษณะเป็นผงละเอียดมีสีขาวถึงสีขาวเหลือง, ไม่มีกลิ่น, สามารถดูดซับน้ำได้และเป็นส่วนผสมที่แข็งตัวเมื่อแห้ง นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านศิลปหัตถกรรมทำเครื่องตกแต่งและงานปั้นต่างๆ ด้านอุตสาหกรรมเซรามิกส์ใช้ทำแม่พิมพ์ และทางด้านการแพทย์นำมาใช้เข้าเฟือกแขนหรือขาเพื่อป้องกันกระดูกที่หักและทำแบบพิมพ์ทำฟัน คนไข้ เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1770 มีการนำโพลิเมทิลเมทาไครเลตมาใช้ในประเทศฝรั่งเศส โดยเฉพาะที่ กรุงปารีสมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย

ส่วนแคลเซียมซัลเฟต ไดไฮเดรต (calcium sulfate dihydrate) มีสูตรทางเคมี $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งจะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติที่เรียกว่า ยิปซัม (gypsum)



ภาพที่ 2 แคลเซียมซัลเฟต เฮมิไฮเดรต (Calcium sulfate hemihydrate)

แคลเซียมซัลเฟต จึงเป็นวัสดุทดแทนกระดูกที่มีการใช้อย่างกว้างขวางเพื่อเป็นกระดูกเสริมในการรักษาผู้ป่วยที่มีการสูญเสียกระดูกไม่ว่าเนื่องจากโรคเนื้องอกหรืออุบัติเหตุก็ตาม วัสดุทดแทนกระดูกที่ดีจะต้องเข้ากันได้กับเซลล์ร่างกายได้ และที่สำคัญตัววัสดุจะทำหน้าที่เป็นโครงร่างเพื่อช่วยให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ขึ้น ปัจจุบันวัสดุทดแทนกระดูกที่มีใช้งานอาจแบ่งกว้างๆ ได้สองประเภทคือประเภทที่ละลายได้หรือมีการดูดซึมกลับ (resorbable) เช่น ไตรแคลเซียมฟอสเฟตและแคลเซียมซัลเฟตและประเภทที่ละลายไม่ได้หรือไม่มีการดูดซึมกลับ (nonresorbable) เช่น ไฮดรอกซี

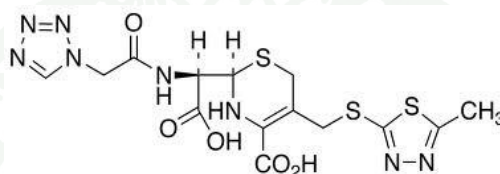
แปปาไทด์แคลเซียมซัลเฟต ได้นำมาใช้เป็นวัสดุทดแทนกระดูกอยู่ในรูปของแคลเซียมซัลเฟตไฮดรอกซีหรือที่ทั่วไปรู้จักกันดีในนามของปูนปลาสเตอร์ (plaster) ซึ่งได้มาจากแร่ยิบซัม และมีการนำปูนปลาสเตอร์มาใช้งานเป็นวัสดุเสริมกระดูกเป็นเวลานาน ตั้งแต่ปี 1892 แต่เพิ่งจะประสบความสำเร็จให้ผลการรักษาที่แน่นอนเมื่อไม่นานมานี้เนื่องจากความสามารถในการพัฒนาปรับปรุงขนาดและรูปร่างอนุภาคของปูนปลาสเตอร์ทำให้สามารถควบคุมอัตราการละลายของวัสดุทดแทนกระดูกนี้ให้ใกล้เคียงกับอัตราการสร้างกระดูกในร่างกายได้

แคลเซียมซัลเฟตมีข้อดีคือ สามารถย่อยสลายได้ โดยไม่ต้องทำการผ่าตัดเพื่อนำลูกบิดออกจากร่างกาย สำหรับการให้ลูกบิดยาปฏิชีวนะที่มีการใช้แคลเซียมซัลเฟตผสมกับยาปฏิชีวนะ จะใช้ในกรณีรักษาผู้ป่วยจากโรคทางกระดูกและการควบคุมการติดเชื้อเนื้อเยื่ออ่อนเริ่มตั้งแต่ปี 1997 พบว่า ได้มีการนำแคลเซียมซัลเฟตมาใช้แทนโพลิเมอร์โดยใช้แคลเซียมซัลเฟตซึ่งเป็นวัสดุทางการแพทย์และWininger and Fass (1996) ได้รายงานในเชิงบวกของการใช้งานในการรักษาร่วมกัน ในกรณีของการรักษาโรคทางกระดูกนำไปสู่กระบวนการรักษาและลดอาการติดเชื้อของเนื้อเยื่ออ่อนเพื่อลดอาการอักเสบได้เป็นอย่างดีสำหรับยาปฏิชีวนะที่นำมาใช้เพื่อเตรียมเป็นลูกบิดยาปฏิชีวนะนั้นต้องมีคุณสมบัติที่สามารถทนต่อความร้อนที่เกิดจากขบวนการโพลิเมอร์ไรเซชัน ดังนั้นยาปฏิชีวนะที่มักนิยมนำมาใช้เตรียมลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอจะเป็นยาในกลุ่มของอะมิโนไกลัยโคไซด์ (aminoglycoside) เช่น เจนด้ามัยซินและโทบรามัยซิน เป็นต้น

นอกจากนี้Anal and Steens (2005); Hanssen (2004); Sasaki *et al.*, (2005); Weiss and Fass (1996) ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดเพื่อใช้ในการเตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะ เช่น เพนิซิลิน (penicillin), แอมพิซิลิน (ampicillin), เซฟาโลสปอริน (cephalosporines), ซิโพรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin), คลินดามัยซิน (clindamycin), โคลิสติน (colistin), อิริโทรมัยซิน (erythromycin), โพลีมัยซิน (polymycin) และแวน โคมัยซิน (vancomycin) เป็นต้นและมีการนำเอาลูกบิดยาเซฟฟาโซลินมาประยุกต์ใช้ในการรักษาแผลที่มีลักษณะเป็นกระเปาะหรือถุงเช่น ฟิสที่กระพุ้งแก้ม หรือฟิสที่อุ้งเท้า กระต่าย เป็นต้นสัตว์ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยใช้ลูกบิดยาเซฟฟาโซลินซึ่งส่วนใหญ่มีการตอบสนองเป็นอย่างดี ทั้งนี้ในการเตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะไม่นิยมใช้ยาปฏิชีวนะหลาย ๆ ชนิดมาผสมกันในแต่ละเม็ดลูกบิด แต่จะมีการนำลูกบิดยาปฏิชีวนะหลาย ๆ ชนิดมาใช้ร่วมกัน

ยาต้านจุลชีพกลุ่มเซฟาโลสปอริน

ยากลุ่มเซฟาโลสปอริน (cephalosporins) เป็นยาถึงสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างทางเคมีเช่นเดียวกับยาในกลุ่มเพนิซิลลิน (penicillins) ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบต่างๆ ของร่างกายอย่างกว้างขวาง ทั้งในกรณีที่รุนแรงและไม่รุนแรงรวมถึงยาในกลุ่มเซฟามายซิน (cephamycins) ด้วยเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อและคุณสมบัติอื่นคล้ายคลึงกันกลุ่มยาเซฟาโลสปอรินจำแนกเป็น 4 รุ่น ตามฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งยาเซฟฟาโซลินจัดเป็นยารุ่นแรกของกลุ่มยาเซฟาโลสปอรินมีสูตร โครงสร้างทางเคมีดังภาพที่ 3 (Petri , 2001)



ภาพที่ 3 สูตร โครงสร้างทางเคมีของยาเซฟฟาโซลิน

ที่มา: Petri (2001)

ยากลุ่มเซฟาโลสปอรินออกฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เหมือนยาในกลุ่มยาเพนิซิลลิน ที่มีโครงสร้างไปแข่งจับกับเอนไซม์ของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) สายแรกทำให้ยับยั้งการเกิดเชื่อมติดกับเปปติโดไกลแคนสายที่สอง ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อมีผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ เอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยกลุ่มยาเพนิซิลลินและเซฟาโลสปอรินนี้อาจเรียกรวมๆ ว่า penicillin-binding proteins (PBPs) ยาในกลุ่มเซฟาโลสปอรินแต่ละรุ่น มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้แตกต่างกัน แต่ทุกรุ่นไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis* และ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (Chambers, 2001)

กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินจัดเป็นกลุ่มยาที่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงค่อนข้างน้อยกว่ายาต้านจุลชีพกลุ่มอื่น ยาทุกรุ่นทำให้เกิดอาการข้างเคียงคล้ายคลึงกัน ยกเว้นยาบางชนิดที่อาจมีอาการข้างเคียงจำเพาะ เช่นปฏิกิริยาการแพ้ (hypersensitivity reactions) เป็นอาการที่พบบ่อยที่สุดจากการใช้ยาในกลุ่มนี้ หากแพ้เพนิซิลลินจะแพ้เซฟาโลสปอรินและในบางรายอาจเกิดภาวะการแพ้ของถุงน้ำดี (Chambers, 2001; Nicholas *et al.*, 1995)

ยากลุ่มเซฟาโลสปอรินมีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียได้กว้างขวาง ทั้งแบคทีเรียที่ใช้ ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งยาเซฟฟาโซลินจัดอยู่ในรุ่นแรกจะมีการฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมบวกได้ ดี แต่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแกรมลบและเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนต่ำ ยาในรุ่นหลังๆจะมีการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ แกรมลบและเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนดีขึ้น โดยเฉพาะยา รุ่นที่ 4 ที่สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ ออกซิเจนแกรมบวกและแกรมลบและเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน นอกจากนั้นยาในกลุ่มนี้ยังมี อาการข้างเคียงเกิดขึ้นน้อย ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ยากลุ่มเซฟาโลสปอรินเป็นที่นิยมใช้อย่าง แพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อชนิดต่าง ๆ (Mitscher, 2002; Quintiliani *et al.*, 1982; Thomas, 2000)

สำหรับยาปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัยคือ ยาเซฟฟาโซลิน (cefazolin) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะใน กลุ่มเซฟาโลสปอริน จัดอยู่ในกลุ่มยา รุ่นที่ 1 (Kastrup *et al.*, 2005) สามารถออกฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อ แบคทีเรียได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ดี เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง, ทางเดินปัสสาวะ, ทางเดินหายใจและกระดูก เป็นต้น โดยเฉพาะแผลฝีและ Wang *et al.*, 2004; Udomkusonsri *et al.* (2012) รายงานสนับสนุนว่า ลูกปัดยาปฏิชีวนะเซฟฟาโซลินสามารถปลดปล่อย ยาเซฟฟาโซลินออกมาได้ดีในระยะเวลาที่เหมาะสม โดยการทำทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) งานวิจัยนี้เลือกใช้ยาเซฟฟาโซลินซึ่งในการเตรียมลูกปัดยาปฏิชีวนะใช้รูปแบบของยาผง สำหรับฉีดจะมีราคาถูกและหาซื้อได้ง่ายกว่ายาเซฟฟาโซลินบริสุทธิ์

ในการใช้ลูกปัดยาปฏิชีวนะอาจเกิดผลข้างเคียงขึ้นได้ โดยมีรายงานการใช้ลูกปัดยาปฏิชีวนะที่มีผลต่อร่างกายในลักษณะแตกต่างกันออกไป เช่น เกิดการระคายเคืองของเนื้อเยื่อบริเวณ ใกล้เคียงที่มีฝังลูกปัดยาปฏิชีวนะ ทำให้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการสมานกระดูกในกรณีที่ฝังลูกปัดใกล้กับ กระดูกที่เสียหาย ซึ่งก่อให้เกิดอาการแพ้ทั้งนี้รวมถึงการคื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย (Hanssen, 2004; Rauschmanna *et al.*, 2005; Ueng *et al.*, 2002) สำหรับการฝังหรือใส่ลูกปัดยาปฏิชีวนะจะปล่อยทิ้ง ไว้ในแผลนานประมาณ 10 วัน ก่อนที่จะทำการผ่าตัดหรือดึงลูกปัดออกจากแผล (Orsini *et al.*, 2004) และ Neut *et al.* (2003) ได้รายงานการตรวจพบระดับยาปฏิชีวนะในร่างกายหลังจากฝังลูกปัดยา ปฏิชีวนะไปนานถึง 5 ปี

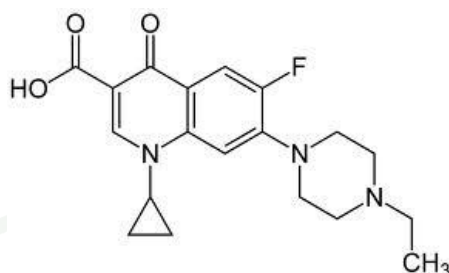
ส่วนวิธีการเตรียมลูกปัดยาปฏิชีวนะจะต้องทำด้วยวิธีการที่ปลอดเชื้อหรือนำไปผ่านกรรมวิธี ที่ทำให้ปลอดเชื้อ เช่น อบแก๊สหรือนำไปผ่านรังสียูวี (UV) เป็นต้น โดยต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพ ของยาและคุณสมบัติของวัสดุไม่ให้คื้อยลงมาจากเดิม (Zahraoui and Sharrock, 1999) ส่วนการเก็บ ลูกปัดยาปฏิชีวนะภายหลังจากการเตรียมเรียบร้อยแล้ว ควรนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -17 °C เพื่อให้สามารถ เก็บไว้ใช้ได้นาน (Krasko *et al.*, 2007) การนำเคลือบเซพมาใช้เพื่อทำเป็นลูกปัดนั้น มีข้อดีของ

แคลเซียมซัลเฟตคือไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและยังสามารถถูกดูดซึมเอาไปใช้ประโยชน์ได้ ถือว่าเป็นวัสดุทางการแพทย์ที่น่าสนใจในการศึกษาและสามารถนำไปพัฒนาต่อไป (Bunmaneeet *et al.*, 2009; Udomkusonsri *et al.*, 2008)

การใช้ลูกบิดยาปฏิชีวนะในทางสัตวแพทย์ โดย Orsini *et al.* (2004) ได้รายงานการใช้ในการรักษาฝีที่ขากรรไกรในกระต่าย อีกทั้งยังใช้ในการรักษาแผลติดเชื้อในม้าจุดประสงค์สำคัญที่มีการนำลูกบิดยาปฏิชีวนะมาใช้ เพื่อต้องการให้ยาปฏิชีวนะมีระดับสูงในบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ แบคทีเรียซึ่งการให้ยาแบบทั่วไปจะให้โดยการฉีดหรือกินนั้น ไม่สามารถทำให้ระดับของยาสูงมากพอในตำแหน่งที่ต้องการ ทั้งนี้ยาปฏิชีวนะจะถูกปล่อยออกมาจากลูกบิดยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องและมักจะไม่ทำให้ระดับยาในกระแสเลือดสูงจนเกิดอันตรายเมื่อมีการนำลูกบิดยาปฏิชีวนะมาใช้อย่างต่อเนื่อง (Wininger and Fass, 1996)

สำหรับการตรวจหาระดับยาต้านจุลชีพสามารถทำได้หลายวิธีเช่นmicrobioassay, high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น ซึ่งวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbioassay) นั้นเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้และสะดวกในการตรวจหาระดับยาต้านจุลชีพ รวมทั้งการตรวจหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดย Pitkin and Martin-Mazuelos (2007) รายงานว่าตั้งแต่ปี 1960 พบหลักฐานการศึกษาวิธี microbiological assay หรือเรียกว่า bioassay ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาความเข้มข้นหรือฤทธิ์ของยาต้านจุลชีพ โดยเริ่มศึกษาจากการวัดระดับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพในของเหลวจากร่างกายผู้ป่วยที่ได้รับยาที่มีช่วงระดับการรักษาที่แคบ เช่น ยากลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์และยากลุ่มแวนโคมัยซิน ซึ่งจากการศึกษานี้เพื่อนำมาใช้เฝ้าระวังไม่ให้ระดับยาในผู้ป่วยสูงจนก่อให้เกิดความเสี่ยงอันตรายหรือความเป็นพิษต่อร่างกายโดยเฉพาะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไตและการวิจัยนี้ศึกษาโดยใช้ยาต้านจุลชีพ คือ เอนโรฟลอกซาซินและเจนด้ามัยซิน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาในการทดสอบกับสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* (TISTR 008) เก็บที่ในอุณหภูมิที่มีความแตกต่างกันและใช้ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกันทดสอบทุกเดือนเป็นระยะเวลา 12 เดือนหรือ 1 ปี

เอนโรฟลอกซาซิน



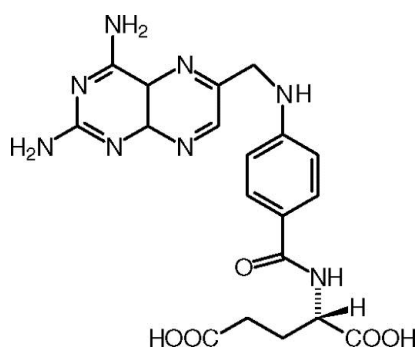
ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาเอนโรฟลอกซาซิน

ที่มา: วรา (2551)

เอนโรฟลอกซาซิน (enrofloxacin) เป็นยาต้านจุลชีพ จัดอยู่ในกลุ่มยาฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolones) ซึ่งยาตัวอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันนี้ ได้แก่ ออร์บิฟลอกซาซิน (orbifloxacin), ซิโปรฟลอกซาซิน (ciprofloxacin), มาร์โบฟลอกซาซิน (marbofloxacin) เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียโดยการยับยั้ง DNA gyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นำมาใช้ในกระบวนการ DNA transcription ของเชื้อแบคทีเรียเพราะจะทำให้ผลของการยับยั้ง DNA gyrase นี้ ไม่สามารถอ่านคำสั่งที่อยู่บน DNA ได้ซึ่งจะได้ผลที่ตามมาคือ เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียตาย แต่ยาในกลุ่มนี้ไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อ DNA gyrase ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุนัข, แมวหรือมนุษย์ได้ เพราะโครงสร้างทางเคมีของตัว DNA gyrase ต่างกันอย่างสิ้นเชิง

อย่างไรก็ตามยาตระกูลฟลูออโรควิโนโลนจะไม่ได้ผลกับการติดเชื้อที่ไม่ใช้ออกซิเจนหรือเรียกอีกอย่างว่า เชื้อแอนาโรบิก (anaerobic bacteria) เช่น ฝีหรือการติดเชื้อในช่องปากเป็นต้น ทั้งนี้อาจจะเกิดผลข้างเคียงตามมาจากการใช้ยาเอนโรฟลอกซาซินเมื่อได้รับยาเกินขนาด เช่น อาการอาเจียนหรือท้องเสีย, กระจกอ่อนตามข้อต่อต่างๆซึ่งพบในสุนัขอายุไม่เกิน 8 เดือนและเกิดความเสียหายต่อจอประสาทตา (retina) ในแมว ซึ่งแมวอาจตาบอดชั่วคราวหรือถาวรจากผลของยาได้ เป็นต้นดังนั้นในกรณีที่มีการหักหรือบดเม็ดยาจะทำให้สัตว์ป่วยสามารถรับรู้รสขมของยาได้การบดยาเพื่อผสมกับอาหารหลายๆชนิด ไม่สามารถดับกลิ่นหรือรสขมของยาได้ และไม่ควรใช้ในตระกูลนี้กับสัตว์ที่มีปัญหาโรคลมชักยาเอนโรฟลอกซาซินสามารถทำให้เกิดผลึกของยาในปัสสาวะได้แต่ยังไม่มียารายงานว่า ยาเอนโรฟลอกซาซินทำให้เกิดนิ่ว (วรา, 2551)

เจนด้ามัยซิน



ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาเจนด้ามัยซิน

ที่มา: Gilbert (2005)

เจนด้ามัยซิน(gentamicin) จัดอยู่ในกลุ่มยาอะมิโนกลัยโคไซด์ (aminoglycoside) ซึ่งเริ่มมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อตั้งแต่ปี 1944 ที่มีการค้นพบยาสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) เป็นยาชนิดแรกของยาในกลุ่มนี้ ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Streptomyces* และ *Micromonospora* หลังจากนั้นได้มีการค้นพบหรือสังเคราะห์ยาในกลุ่มนี้ได้อีกหลายชนิด ปัจจุบันมียาในกลุ่มนี้ที่นำมาใช้ทางคลินิกทั้งสิ้น 13 ชนิด ส่วนใหญ่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบชนิดใช้ออกซิเจน นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มเบต้า-แลคแทม (β -lactams) หรือแวนโคมัยซินเพื่อเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ *streptococci*, *enterococci* และ *staphylococci* ควรหลีกเลี่ยงการให้ยากลุ่มนี้ร่วมกับยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (bacteriostatic agents) เช่น คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) หรือเตตราไซคลิน (tetracycline) เนื่องจากยาจะต้านฤทธิ์กัน (antagonistic effect)

นอกจากนี้ยากลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์มีพิษที่ไม่พึงประสงค์ที่สำคัญคือ ทำให้เกิดพิษต่อไต (nephrotoxicity) และหู (ototoxicity) ในระยะต่อมามียาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นที่มีประสิทธิภาพดีและมีพิษที่ไม่พึงประสงค์น้อยกว่า ทำให้การใช้ยากลุ่มนี้ทางคลินิกน้อยลงส่งผลให้เชื้อส่วนใหญ่ยังคงไวต่อยาในกลุ่มนี้ ในปัจจุบันมีปัญหาเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น อีกทั้งมีวิธีการบริหารยาและความเสี่ยงต่อพิษที่ไม่พึงประสงค์จากยาดังกล่าว ทำให้ยากลุ่มนี้กลับมามีบทบาทและมีการใช้ทางคลินิกมากขึ้น

ยาในกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์โดยผลิตหรือสังเคราะห์ได้จากเชื้อแบคทีเรีย 2 ตระกูล คือ *Streptomyces* และ *Micromonospora* โดยจะสังเคราะห์ในกลุ่มนี้ที่ลงท้ายด้วย-mycin จะได้มาจากเชื้อ *Streptomyces* แต่ถ้าลงท้ายด้วย -micin จะได้มาจากเชื้อ *Micromonospora* ปัจจุบันยาในกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ที่นำมาใช้ทางคลินิก เช่น อะมิกาซิน (amikacin), เจนด้ามัยซิน, นีโอมีซิน (neomycin) และ กานามัยซิน (kanamycin) เป็นต้น ยาในกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์แบ่งออกได้ 5 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมีของยา (Gilbert, 2005) ยาเจนด้ามัยซินมีคุณสมบัติ คือ มีความเป็นประจุบวกสูง (strongly cationic) สามารถละลายน้ำได้ดีแต่ไม่ค่อยละลายในไขมัน ออกฤทธิ์ได้ดีในภาวะที่เป็นด่างมากกว่าภาวะที่เป็นกรด ทำให้ยาในกลุ่มนี้ถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหารได้น้อยและผ่าน blood brain barrier ได้ไม่ดี รวมถึงเป็นยาที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Souza *et al.*, 2004) ได้ดี

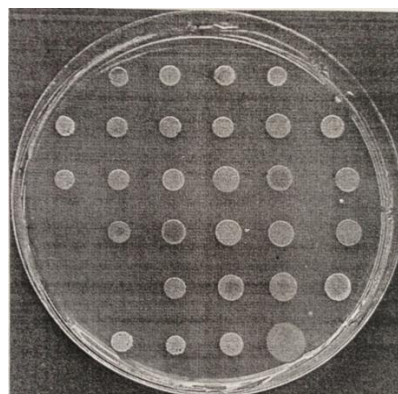
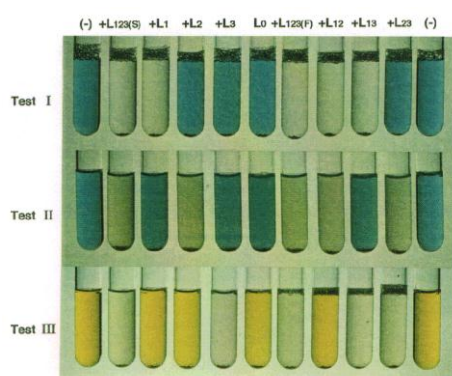
McLaughlin and Reeves (1971); Walterspiel *et al.* (1991) ได้รายงานจากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า ยาในกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์จะมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียลดลงเมื่อมียาในกลุ่มเบต้า-แลคแทมอยู่ด้วยยาในกลุ่มเบต้า-แลคแทมที่เกิดปฏิกิริยานี้มากที่สุดคือ ยาในกลุ่มเพนิซิลลิน (penicillins) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ปฏิกิริยาระหว่างยาที่เกิดขึ้นนี้ไม่มีผลมากนัก ยาเจนด้ามัยซินมีกลไกการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal agents) โดยยาจะจับกับ 30S ribosomal subunit ใน messenger RNA ทำให้มีการสร้างโปรตีนลดลงและสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไปเกิดการรั่วไหลของสารที่มีประจุออกนอกเซลล์และยับยั้งการแบ่งตัวของ DNA (Lynch and Puglisi, 2001) โดยทั่วไปถ้าค่า MIC ของเชื้อ *enterococci* ต่อยาเจนด้ามัยซินมากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหรือค่า MIC ของเชื้อต่อยาสเตรปโตมัยซินมากกว่า 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมถือว่าเชื้อมีการดื้อยาในระดับสูง และ Stengel *et al.* (2001); Brause (2005) รายงานว่าในปัจจุบันมีการนำสารที่เชื่อมต่อกระดูกและวัสดุเทียมมาผสมยาปฏิชีวนะ ยาที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ ยาโทบราไมซินหรือเจนด้ามัยซิน อาจจะมีหรือไม่มียาแวนโคมัยซินร่วมด้วย นำมาทำ impregnated antibiotic methylmethacrylate bone cement มาใช้ในการรักษากระดูกกลุ่มนี้โดยใช้ในช่วงที่ทำการผ่าตัดเพื่อใส่วัสดุเทียมใหม่เนื่องจากจะให้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะในระดับที่สูงแก่กระดูกและเนื้อเยื่อที่อยู่โดยรอบในระยะเวลายาวนาน รวมทั้งลดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์ตามระบบ (systemic adverse effect) จากยาและยาระยะเวลาที่จะต้องทำการผ่าตัดเพื่อใส่วัสดุเทียมใหม่อีกครั้ง พบว่าการรักษาประสบความสำเร็จถึงร้อยละ 90-96 ในการรักษาการติดเชื้อที่ข้อสะโพกเทียมและร้อยละ 97 ในการรักษาการติดเชื้อที่ข้อเข่าเทียม

ดังนั้นหากกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ยังคงมีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีในปัจจุบัน และจากปัญหาเชื้อดื้อยาที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ยากลุ่มนี้กลับมามีบทบาททางคลินิกอีกครั้ง โดยการ ใช้ยากลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์ร่วมกับยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตามการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวกโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *enterococci* (Schiffelers *et al.*, 2001)

สำหรับการทดสอบตรวจหาปริมาณตกค้างของสารและยาปฏิชีวนะต่างๆ ในตัวอย่างนั้น มีหลากหลายวิธีที่สามารถนำมาใช้ทดสอบตรวจหาความเข้มข้นระดับของยาหรือสารต้านจุลชีพ เช่น microbioassay, high performance liquid chromatography (HPLC), fluorometry, radioenzymatic assay (RIA) และ enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) เป็นต้น (Pitkin and Martin-Mazuelos, 2007) และการวิจัยนี้ศึกษาโดยใช้ยาต้านจุลชีพ คือ เอนโรฟลอกซาซินและเจนด้ามัยซิน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ในการทดสอบกับสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* (TISTR 008) เก็บที่ ในอุณหภูมิที่มีความแตกต่างกันและใช้ความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกันทดสอบทุกเดือน เป็นระยะเวลา 12 เดือนหรือ 1 ปี

วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

การวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbioassay) เป็นวิธีที่ใช้วัดระดับยาทั้งหมดในตัวอย่าง ที่ indicator organism มีการสนองตอบเนื่องจากวิธีนี้ไม่สามารถระบุได้ว่า มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพกี่ ชนิด แต่จะระบุได้เพียงว่ามีการยับยั้งจุลชีพ (Andrews, 1999) วิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา แบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ broth dilution method และ agar dilution method วิธีแรกเป็นวิธีการนำสาร ต้านจุลชีพใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีจุลชีพ และวิธีที่สองเป็นการนำสารต้านจุลชีพหยดลงบน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีจุลชีพ (seeded agar) ในส่วนของฤทธิ์ในการต้านจุลชีพซึ่งเป็นผลมาจากการ ยับยั้งจุลชีพ เช่น วิธี broth dilution วัดจากความขุ่นของ broth และสำหรับวิธี agar dilution จะวัด จากการเจริญของเชื้อที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบดังนั้นในการเลือกชนิดของ indicator organism และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อต้องคำนึงถึงความไวของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ กับยาและความชัดเจนในการตอบสนองที่ปรากฏขึ้น



(ก) broth dilution method ทดสอบด้วยอาหาร
เลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

(ข) agar dilution method ทดสอบด้วยอาหาร
เลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

ภาพที่ 6 การทดสอบความไวของเชื้อ

ที่มา: Hewitt (2004)

เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเป็นวิธีการวัดในเชิงปริมาณ (quantitative) หรือวัดความแรง (potency) ของสารต้านจุลชีพ (Hewitt, 2004; Pitkin and Martin-Mazuelos, 2007) โดยการเปรียบเทียบการตอบสนองระหว่างจุลชีพกับสารต้านจุลชีพที่ทราบความเข้มข้นและการตอบสนองของจุลชีพกับตัวอย่าง โดยอาศัย standard response curve ซึ่งวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาสามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพ (quality control) ของผลิตภัณฑ์ที่ปลอดเชื้อหรือไม่ปลอดเชื้อ (sterile และ non-sterile products) และคุณภาพของสารต้านจุลชีพ เป็นต้น (Norman, 2002) ในปัจจุบันวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยายังเป็นที่นิยมใช้ทางการศึกษาทางเภสัชวิทยา ไม่ว่าจะเป็นทางของเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) รูปแบบต่าง ๆ ในสัตว์ ประสิทธิภาพความแรงของผลิตภัณฑ์ ถึงแม้ว่าจะมีวิธีอื่นที่สามารถใช้ตรวจหาความเข้มข้นระดับของยาหรือสารต้านจุลชีพ เช่น high performance liquid chromatography (HPLC), fluorometry, radioenzymatic assay (RIA) และ enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) เป็นต้น (Pitkin and Martin-Mazuelos, 2007)



(ก) เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

(ข) เครื่อง fluorometry

ภาพที่ 7 เครื่องตรวจหาความเข้มข้นระดับของยาหรือสารต้านจุลชีพ

ที่มา: Pitkin and Martin-Mazuelos (2007)

สำหรับวิธีการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาจะต้องใช้เชื้อแบคทีเรีย สำหรับแบคทีเรียที่เป็นตัวทดสอบ(bacterial indicator) ที่นิยมใช้ในการศึกษาด้านจุลชีพมีการเลือกเชื้อหลายชนิด เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Micrococcus luteus* (Haessler *et al.*, 2003; Ismail, 2005; Petrikkos *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2006) สำหรับการใส่เชื้อ *B. subtilis* ในวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา นิยมใช้ในรูปแบบสปอร์ จะช่วยให้ได้ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) ที่ชัดเจนกว่าในรูปแบบ vegetative form (Jinks *et al.*, 1985) และนิยมใช้สปอร์ของ *B. subtilis* เป็นดัชนีในการควบคุมคุณภาพของกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อ (sterilization) Reich (1980) ได้รายงานการพบสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* สามารถเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25–30 องศาเซลเซียส) และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลานานถึง 2 ปีและ Jinks *et al.* (1985) รายงานอีกว่าสามารถเก็บสปอร์ของ *B. subtilis* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานถึง 1 ปีเพื่อใช้ในการวิธี screening assay สำหรับ genetic metabolism defect

เชื้อแบคทีเรียบาซิลลัสซับทีลิส



ภาพที่ 8 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

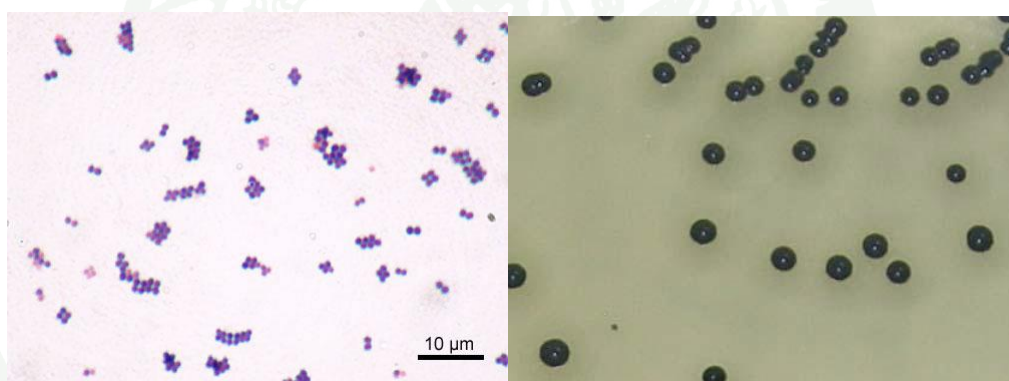
ที่มา: ศิวาพร (2542)

เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคและมีลักษณะเซลล์เป็นรูปท่อนตรง เป็น rod-shaped group สามารถเคลื่อนที่ได้ จะติดสีแกรมบวกคือ เมื่อนำมาข้อมด้วย crystal violet ยังคงติดสีน้ำเงินหรือม่วงหลังจากล้างด้วยแอลกอฮอล์ (95% Ethanol) จึงเป็นจุลินทรีย์แกรมบวก (gram positive) (Garrett and Grisham, 1999) หายใจโดยใช้ออกซิเจนเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็น จุลินทรีย์ที่พบในสิ่งแวดล้อมเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่เกิดจากแหล่งน้ำและสามารถพบได้ทั่วไป ในดิน มีการเจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของซากพืชซากสัตว์และอื่นๆ แบคทีเรียจำพวก *B. subtilis* สร้างและหลั่งเอนไซม์พวกคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และโปรตีเอส (protease) ออกจากเซลล์ได้หลายชนิดทำให้สามารถย่อยสลายสารต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น เซลลูโลส, แป้งและโปรตีนต่างๆ ได้มาก ส่วนใหญ่ถ้าเป็นดินที่มีสารอาหารมากจะพบประมาณ 10^7 - 10^8 เซลล์ในดิน 1 กรัม แต่ถ้าในดินที่มีสารอาหารน้อยก็อาจจะพบในจำนวนน้อย

โดยเชื้อ *B. subtilis* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถทำการเพาะเชื้อเจริญใน nutrient agar และ nutrient broth การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* เป็นแบบสร้างสปอร์ แต่มันๆ ครั้งจะเป็นแบบโซ่ (chains) เพื่อที่จะสามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่เป็นกรดและจะใช้ออกซิเจนในการหายใจ

คุณสมบัติที่น่าสนใจของแบคทีเรียชนิดนี้อีกประการ คือ มีความหลากหลายในทางชีวเคมี ทำให้สามารถปรับตัวให้อยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง (extreme condition) ต่างๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงและสภาพเป็นด่างได้ดี มีหลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้แม้ในที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียสหรือเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่ยังสามารถเติบโตได้ที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เป็นต้น คุณสมบัติการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงเป็นที่ต้องการอย่างมากในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียชนิดนี้จะทนทานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ทำให้ทนทานต่อระดับอุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมและมีอายุการใช้งานที่นาน ทั้งทนทานต่อสารที่มักทำลายโปรตีนได้ เช่น ผงซักฟอก (detergent) และ ตัวทำละลายสารอินทรีย์ (organic solvents) เป็นต้น (คิวพร, 2542)

เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส



ภาพที่ 9 เชื้อ *S. aerues*

ที่มา: Garrett and Grisham (1999)

เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส (*S. aerues*) เป็นจุลินทรีย์ในตระกูล *Micrococcaceae* ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก (gram positive) คือ เมื่อนำมาย้อมด้วย crystal violet ยังคงติดสีน้ำเงินหรือม่วงหลังจากล้างด้วยแอลกอฮอล์ (95% Ethanal) ส่วนพวกที่ไม่ติดสี crystal violet แต่จะติดสีที่ย้อมทับเมื่อเติม counterstain ได้แก่ safranin จะติดเป็นสีแดง แสดงว่า เชื้อแบคทีเรีนั้นเป็นเชื้อแกรมลบ (gram negative) (Garrett and Grisham, 1999) เชื้อ *S. aerues* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลมเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่นหรือเป็นคู่หรืออาจเป็นสายสั้นๆ ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้โคโลนีจะ

เป็นกลม ขอบเรียบนูน มีสีเหลืองหรือสีทองเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่มีออกซิเจน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียสและช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 30-37 องศาเซลเซียสทนความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ส่วนความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ที่ 7-7.5 เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส บางสายพันธุ์ผลิตสารพิษที่เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน ทำให้อาหารเป็นพิษซึ่งเอนเทอโรทอกซินที่ผลิตมีหลายชนิด แต่ชนิดที่พบว่าทำให้เกิดอาหารเป็นพิษคือ ชนิดเอ และดี

เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส มีแหล่งที่มาคือ ในอากาศ, ผุ่นละออง, ขยะมูลฝอย, น้ำ, อาหาร และนมหรืออาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้โดยจะพบอยู่ตามโพรงจมูก, เยื่อบุทางเดินหายใจ, ลำคอ, ผิวหนัง, ทางเดินอาหาร บาดแผลที่เป็นฝีและหนอง รวมถึงในดินผุ่นละออง เป็นต้น การเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ทำให้อาหารที่มีการปนเปื้อนอยู่แล้วมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อและสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็ว อาหารที่มักพบเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อเนื้อสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์จากไข่และผลิตภัณฑ์นม ที่มักจะเก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมและเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน

เชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษได้ คือเอนเทอโรทอกซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ดี เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ สารพิษชนิดนี้สามารถทนต่อความร้อนสูงถึงระดับ 143.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาทีได้ ดังนั้นอุณหภูมิในการหุงต้มธรรมดาหรืออุณหภูมิน้ำเดือดจึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส มีชื่อเรียกว่า *Staphyloenterotoxycosis* และ *Staphyloenterotoxemia* ลักษณะอาการที่บ่งบอกว่าติดเชื้อสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส นั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในหลายๆ กรณี ซึ่งอาการทั่วไปของผู้ได้รับเชื้อที่พบ คือ คลื่นไส้, อาเจียน, วิงเวียน, อ่อนเพลีย และมีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะๆ รวมทั้งอาจมีการเด่นของชีพจรผิดปกติ เป็นต้น ขนาดที่ได้รับสารพิษจากการปนเปื้อนในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัมจะสามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ และหากมีปริมาณถึง 100,000 เซลล์ต่อกรัมอาหารทำให้เกิดโรคติดเชื้อเฉียบพลัน (acute infection) ทำให้เกิดฝีและหนองขึ้นได้ (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค, 2548; ศิวาพร, 2542)

สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาระยะเวลาการเก็บและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* เพื่อใช้ในการทดสอบหาหรือสารตกค้างในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ทั้งนี้จะต้องมีการเตรียมสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* สำหรับใช้ทดสอบ ซึ่งการเตรียมสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* จะต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 7-10 วัน จึงสามารถเก็บเชื้อในรูปสปอร์ได้และนำไปเข้าสู่เย็นได้เป็นเวลานานหรือสามารถเก็บในอุณหภูมิห้องได้นานประมาณ 2 วัน ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ควรมีการศึกษาระยะเวลาการเก็บและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* โดยการนำวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยามาใช้ในการทดสอบเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการใหม่ ๆ ทางสัตวแพทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. แคลเซียมซัลเฟต (Calcium sulfate hemihydrate) (Sigma)
2. โพลีเมทิลเมทาไครเลต (Polymethylmetracylate, PMMA) และสารละลายโมโนเมอร์ (Monomer) (Acrylic Simplex rapid, Kemdent)
3. เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ร้อน
4. เครื่องดูดจ่ายสารละลายหลายช่องทาง
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน
6. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
7. เครื่องทำให้ปลอดเชื้อโดยวิธีการอบแก๊ส
8. ถาดอาหารเพาะเชื้อ
9. เชื้อ *Bacillus subtilis* (ATCC 6633, TISTR 008) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย ศูนย์จุลินทรีย์)
10. เชื้อ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, TISTR 517) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย ศูนย์จุลินทรีย์)
11. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
12. แบบหล่อซิลิโคน ขนาด 0.5 มิลลิเมตร

13. น้ำกลั่น (Distilled water)

14. น้ำเกลือ (Normal saline)

15. ยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด ได้แก่

15.1 เจนติอัมัยซิน เป็นสารมาตรฐาน (Gentamicin) (Sigma)

15.2 เซฟฟาโซล (Cefazol[®]) เป็นยาผงสำหรับฉีด (Cefazolin) (1 gm., General Drugs House Co., Ltd)

15.3 เอนโรฟลอกซาซิน เป็นสารมาตรฐาน (Enrofloxacin) (Sigma)

16. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (Phosphate Buffer Saline) (0.1M PBS, pH 7.4)

17. หม้ออบความดันไอน้ำ (Autoclave)

18. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

19. อาหารเลี้ยงเชื้อ

19.1 Mueller Hinton agar (MHA) (Difco)

19.2 Antibiotic medium No. 5 (Difco)

19.3 Tryptic soy agar (TSA) (Difco)

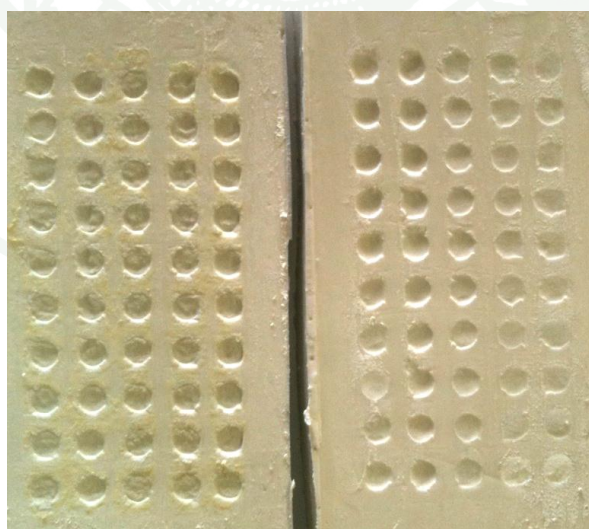
19.4 Tryptic soy broth (TSB) (Difco)

วิธีการ

1. ศึกษาการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตและลูกบิดโพลีเมทิลเมทาไครเลต (พีเอ็มเอ็มเอ)

1.1 การเตรียมลูกบิดยาเซฟฟาโซลินจากแคลเซียมซัลเฟตและโพลีเมทิลเมทาไครเลต (พีเอ็มเอ็มเอ) ที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางคลินิก (commercial formulation)

เตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะ โดยใช้ยาเซฟฟาโซลิน (Cefazol[®]) ชนิดผงสำหรับฉีดที่ใช้ในทางคลินิกผสมกับแคลเซียมซัลเฟต (calcium sulfate, Sigma) ในสัดส่วนยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัมต่อแคลเซียมซัลเฟต 10 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงไปคนให้เข้ากัน และส่วนพีเอ็มเอ็มเอ (Simplex rapid) ใช้ในสัดส่วนยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัมต่อพีเอ็มเอ็มเอ 10 กรัม และเติมสารละลายโมโนเมอร์ (monomer) 4.5 มิลลิลิตร ลงไปคนให้เข้ากัน จากนั้นเทส่วนผสมดังกล่าวลงในแบบหล่อซิลิโคนที่เตรียมไว้ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วแกะลูกบิดยาปฏิชีวนะออกจากแบบหล่อ หลังจากนั้นนำลูกบิดยาปฏิชีวนะไปผ่านเครื่องทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้วิธีการอบแก๊ส (gas sterilization) แล้วจึงทำการวัดขนาดและชั่งน้ำหนักลูกบิดยาปฏิชีวนะทุกเม็ดเลือกมีน้ำหนักใกล้เคียงกันเพื่อรอการทดสอบต่อไป โดยศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอ



ภาพที่ 10 การหล่อลูกบิดยาปฏิชีวนะโดยใช้แบบหล่อซิลิโคน



(ก)



(ข)

(ก) ลูกปัดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต

(ข) ลูกปัดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอ

ภาพที่ 11 ลูกปัดยาปฏิชีวนะ

1.2 ศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกปัดแคลเซียมซัลเฟตและโพลีเมทิลเมทาไครเลต (พีเอ็มเอ็มเอ)

นำลูกปัดยาปฏิชีวนะในแต่ละกลุ่มจำนวน 10 เม็ด แบ่งใส่ลงในหลอดแก้ว 5 หลอด หลอดละ 2 เม็ด ในหลอดแก้วมีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (Phosphate Buffer Saline, 0.1M PBS, pH 7.4) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และเก็บหลอดแก้วไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์เก็บในหลอดตัวอย่าง แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ใหม่ในปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วเดิมและเก็บตัวอย่างสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ทุกๆ 24 ชั่วโมง ทำเช่นนี้ต่อเนื่องกันนาน 7 วัน ส่วนสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ตัวอย่างให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อการทดสอบต่อไป โดยใช้วิธีทดสอบทางจุลชีววิทยา (microbioassay) ซึ่งใช้สปอร์เชื้อ *B. subtilis* (TISTR 008) เป็น indicator

เปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากวัสดุทั้งสอง โดยการวิเคราะห์สถิติด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

1.3 ศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกจากลูกปัดแคลเซียมซัลเฟตที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นของยาแตกต่างกัน

เตรียมลูกปัดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต โดยจัดเตรียมในสัดส่วนของยาเซฟฟาโซลิน (Cefazol[®]) ต่อ แคลเซียมซัลเฟต ดังนี้

3.1 ยาเซฟฟาโซลิน 1.0 กรัมต่อแคลเซียมซัลเฟต 10 กรัม (ใช้จากข้อ 1.1)

3.2 ยาเซฟฟาโซลิน 0.5 กรัมต่อแคลเซียมซัลเฟต 10 กรัม

3.3 ยาเซฟฟาโซลิน 0.25 กรัมต่อแคลเซียมซัลเฟต 10 กรัม

จากนั้นทำการศึกษาการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินเป็นระยะเวลา 7 วันเช่นเดียวกับการศึกษาตามข้อ 2

นำผลการทดลองมาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาของลูกปัดแคลเซียมซัลเฟตทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธีการทางสถิติโดยใช้วิธี ANOVA และหาความสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างปริมาณยาเซฟฟาโซลินที่ปล่อยออกมาและความเข้มข้นของยาในลูกปัดยาปฏิชีวนะ (correlation analysis) โดยใช้ค่าที่วัดได้ของการปลดปล่อยยาจาก antibiotic beads และความเข้มข้นต่างๆของยาเซฟฟาโซลินเป็นตัววิเคราะห์

1.4 ศึกษาระดับยาเซฟฟาโซลินโดยวิธี microbioassay

การวัดระดับยาที่ปลดปล่อยออกจากเม็กลูกปัดยาเซฟฟาโซลินที่ได้โดยใช้วิธี agar diffusion method โดยใช้เชื้อ *B. subtilis* (TISTR 008) เป็นเชื้อทดสอบ เตรียมเชื้อโดยการนำเชื้อแบคทีเรียละลายในน้ำเกลือ (normal saline) ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ โดยเตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ 0.39-0.40 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, O.D.) โดยมีความยาวคลื่น (wavelength) ที่ 580 นาโนเมตร จากนั้นนำเชื้อที่ได้ผสมลงใน Mueller Hinton agar (MHA) (Elsheikh *et al.*, 1997; Paris *et al.*, 1995) ในอัตราส่วนแบคทีเรียต่อ MHA (1:100 ml) เทใส่ถาดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร เมื่อ seeded agar แข็งตัวทำการเจาะหลุมเพื่อสำหรับหยอดสารละลายตัวอย่างและยาเซฟฟาโซลินมาตรฐาน และเตรียมยาเซฟฟาโซลินมาตรฐาน (Sigma) ที่ความเข้มข้นที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ในการเจือจาง จากนั้นหยอดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินในแต่ละวันและยาเซฟฟาโซลินมาตรฐานที่เตรียมไว้ลงในหลุมปริมาตร 70 μl ที่เจาะหลุมไว้ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7

มิลลิเมตรแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นอ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเขตการยับยั้งเชื้อ และนำค่าที่ได้ไปหาค่า standard curve และนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ

1.5 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของยาเซฟฟาโซลิน

การทดสอบหาค่า MIC ของยาเซฟฟาโซลินด้วยวิธี broth microdilution method (Clinical and laboratory standards institute, 2006) ซึ่งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ *S.aureus* (ATCC 25923, TISTR 517) วิธีการ คือ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA, Difco) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสต่อจากนั้นนำเชื้อ 1-2 โคโลนีที่มีอายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว tryptic soy broth (TSB, Difco) เตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ 0.08 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, O.D.) โดยมีความยาวคลื่น (wavelength) ที่ 625 นาโนเมตร จากนั้นเจือจางแบคทีเรียด้วย TSB ในสัดส่วนแบคทีเรีย 1 ต่อ TSB10 โดยเตรียมให้ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ส่วนการเตรียมยาเซฟฟาโซลินซึ่งเจือจางโดยใช้น้ำกลั่น และใช้สารละลายของยาเซฟฟาโซลินที่ความเข้มข้น 1024 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) โดยเตรียม serial dilution ซึ่งใช้ TSB เป็นตัวเจือจางเจือจางแบบ two-fold dilution นำไปทดสอบใน 96 well plate

จากนั้นนำมาทดสอบหาค่า MIC ที่ทดสอบใน 96 well plate โดยเติม TSB ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม ยกเว้น column ที่ 1 แล้วเติมสารละลายของยาเซฟฟาโซลินที่เตรียมไว้ข้างต้นในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน column ที่ 1 และ 2 ยกเว้นแถว A และ H ต่อจากนั้นเจือจางแบบ two-fold dilution จาก column ที่ 2 ไปเรื่อย ๆ โดยใช้เครื่องดูดจ่ายสารละลายหลายช่องทาง (multi-channel pipette) ไปจนถึง column สุดท้าย (B12-G12) จากนั้นเติม bacterial suspension ที่เตรียมจากข้างต้นในปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงไปทุกหลุม ยกเว้นแถว A ไม่ต้องเติมเชื้อให้เต็มด้วย TSB แทน เนื่องจากแถวจะเป็นตัวควบคุมทางลบ (negative control) คือ มีสารละลายยาเซฟฟาโซลินแต่ไม่เติมเชื้อสำหรับแถวสุดท้ายหรือแถว H จะเป็นตัวควบคุมทางบวก (positive control) ซึ่งมีเชื้อแต่ไม่เติมสารละลายยาเซฟฟาโซลิน จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและตรวจดูความขุ่นด้วยตาเปล่าหลังจากบ่มนาน 18 ชั่วโมง บันทึกค่า MIC ซึ่งเป็นหลุมสุดท้ายที่ไม่ขุ่นคือ ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ ถ้าขุ่นคือ เชื้อมีการเจริญเติบโต โดยจะดูที่ความขุ่น

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ATCC 6633 หรือ TISTR 008) ในการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (microbioassay)

2.1 การเตรียมสปอร์ใช้เพื่อของเชื้อ *B. subtilis*

เลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (ATCC 6633 หรือ TISTR 008) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ขั้นตอนในการเตรียมสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* เพื่อใช้ในการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

วันที่	กิจกรรม
1	เพาะเชื้อ <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633 หรือ TISTR 008) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA)
2	การเพาะเชื้อต่อช่วงครั้งที่ 1 (1 st subculture)
3	การเพาะเชื้อต่อช่วงครั้งที่ 2 (2 nd subculture)
4	- ใช้น้ำเกลือประมาณ 1 มิลลิลิตร การล้างโคโลนีแบคทีเรียออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ - กระจาย bacterial suspension ลงบน MHA ให้ทั่วผิวหน้าโดยใช้เครื่องมือทำให้กระจาย (spread) ในการกระจายเชื้อ จากนั้นบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน
11	- นำเอาอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการล้างเชื้อด้วยน้ำเกลือบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเก็บ bacterial suspension ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร - บั่นแยกตะกอนแบคทีเรีย ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15-30 นาที จากนั้นเทส่วนใส (supernatant)ทิ้งไป เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ แล้วเติมน้ำเกลือปริมาตร 5-10 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน ก่อนนำไปปั่นแยกอีกครั้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที (รวมปั่นล้าง 2 รอบ) - หลังจากเทส่วนใสทิ้งไป ให้เติมน้ำเกลือลงไป ปริมาตรที่ใส่ขึ้นกับปริมาณตะกอนที่เหลือ อาจใส่เพียง 5 หรือ 10 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน - นำเชื้อที่ได้มาต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 70 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำเชื้อที่ได้แบ่งเก็บใส่หลอด ปิดจุกแล้วพันทับด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) เพื่อกันระเหยของน้ำเกลือ

2.2 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* เป็นระยะเวลา 1 ปี

นำสปอร์เชื้อที่เตรียมในข้อ 2.1 แบ่งใส่หลอด หลอดละ 10-15 มิลลิลิตร จากนั้นปิดด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) แล้วเก็บใส่ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอีกส่วนเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เพื่อนำมาใช้สำหรับทดสอบในแต่ละอุณหภูมิ

จากนั้นเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบยาปฏิชีวนะคือ ยาเอนโรฟลอกซาซินและยาเจนด้ามัยซิน หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียละลายในน้ำเกลือ (normal saline) ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ โดยเตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ 0.39-0.40 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, O.D.) โดยมีความยาวคลื่น (wavelength) ที่ 580 นาโนเมตร

เมื่อได้ค่าตามต้องการแล้ว จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ดังนี้ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการหลอม Mueller Hinton Agar ซึ่งใช้เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (hotplate stirrer) ที่อุณหภูมิ 100-150 องศาเซลเซียสเพื่อให้ละลายเข้ากันกับน้ำกลั่นแล้วนำไปใส่หม้ออบความดันไอน้ำ (autoclave) ที่มีแรงดัน 15 ปอนด์ โดยใช้อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เพื่อให้อุณหภูมิลดลงถึง 48 ± 2 องศาเซลเซียสแล้วนำมาผสมสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมข้างต้นลงไปในส่วนแบคทีเรียต่อ MHA (1:100 ml) หมุนขวดเพื่อให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอ หลังจากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีสปอร์เชื้อ *B. subtilis* ลงในถาดอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ถาดละ 20 มิลลิเมตรเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ลงในเนื้ออาหารชนิดแข็งสำหรับหยอดตัวอย่างยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้คือ ยาเอนโรฟลอกซาซินมาตรฐาน (Sigma) ที่เตรียมในความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 และ 3.00 พีพีเอ็ม (ppm) โดยใช้สาร 10 M NaOH 1-2 หยดช่วยในการละลายและใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ในการเจือจาง และยาเจนด้ามัยซินมาตรฐาน (Sigma) ที่เตรียมในความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 และ 10.00 พีพีเอ็มโดยใช้น้ำกลั่นในการเจือจาง จากนั้นนำถาดที่หยอดตัวอย่างแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใน 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการวัดค่าเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) ซึ่งเป็นวงใสรอบหลุมที่หยอดยา โดยใช้ไม้บรรทัดวัดอย่างละเอียด (vernier) ซึ่งระดับยาปฏิชีวนะในตัวอย่างคำนวณจากเส้นตรงมาตรฐาน (standard curve) ของเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อของยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

(standard antibiotic) กับค่าลอการิทึมความเข้มข้น (log concentration) ของยาปฏิชีวนะ โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดสอบอย่างน้อย 12 ซ้ำ

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาทุก 1 เดือน ต่อเนื่องเป็นเวลา 12 เดือน โดยใช้สไปร์ของเชื้อ *B. subtilis* และคำนวณหาเส้นตรงมาตรฐาน (standard curve) จากค่าเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่างๆของยาปฏิชีวนะมาตรฐาน (standard antibiotic) พร้อมทั้งคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ทุก ๆ เดือน และนำค่าเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อและความเข้มข้นต่าง ๆ ของยาปฏิชีวนะมาตรฐานทั้ง 12 เดือนมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Factorial in Randomized Complete Block Design (Factorial in RCBD)

สถานที่ทำการศึกษา

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดเคลือบเซรามิคและลูกบิดพีอีเอ็มเอ็มเอ

1.1 การเตรียมลูกบิดยาเซฟฟาโซลินจากเคลือบเซรามิคและโพลิเมทิลเมทาไครเลต (พีอีเอ็มเอ็มเอ) ที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางคลินิก (commercial formulation)

การเตรียมลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน พบว่า น้ำหนักของลูกบิดยาก่อนนำไปทดสอบกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-เคลือบเซรามิคที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน 0.25, 0.5 และ 1 กรัม (g) มีน้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละเม็ดลูกบิดเท่ากับ 0.157 ± 0.001 , 0.158 ± 0.000 และ 0.160 ± 0.001 กรัม (mean $\pm$ S.D) ตามลำดับ และกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีอีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน 1 และ 2 กรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละเม็ดลูกบิดเท่ากับ 0.110 ± 0.003 และ 0.119 ± 0.004 กรัม ตามลำดับ ซึ่งลูกบิดยามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 5.32 ± 0.09 มิลลิเมตรและหนา 4.12 ± 0.04 มิลลิเมตร มีรูปทรงกระบอก

1.2 ศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดเคลือบเซรามิคและโพลิเมทิลเมทาไครเลต (พีอีเอ็มเอ็มเอ)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดเคลือบเซรามิคและโพลิเมทิลเมทาไครเลต (พีอีเอ็มเอ็มเอ) พบว่าในวันที่ 1 กลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-เคลือบเซรามิคที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลินที่ 1.0 กรัม พบว่า มีการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกจากลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-เคลือบเซรามิค ในปริมาณที่สูงกว่าทุกวัน ต่อมาในวันที่ 2 ถึงวันที่ 8 สามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้ในปริมาณลดลงมาเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 8 จะมีระดับต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีอีเอ็มเอ็มเอ ซึ่งมีการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้ในระดับที่ต่ำกว่า (ตารางที่ 2 และภาพที่ 13) และเมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า วัสดุที่ใช้ทำลูกบิดยาปฏิชีวนะมีผลทำให้การปลดปล่อยยาปฏิชีวนะเกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัมสามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินในระยะเวลา 8 วัน โดยมีผลรวมเฉลี่ยในแต่ละเม็ดลูกบิดเท่ากับ 22.79 ± 0.27 มิลลิกรัมต่อเม็ด และมีผลรวมสะสมของการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินเฉลี่ยเท่ากับ 30.02 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อเม็ดและสามารถปลดปล่อยยาได้ 75.95 ± 0.88 % (mean $\pm$ S.D) (ตารางที่ 4) และลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัม สามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินในระยะเวลา 8 วัน โดยมีผลรวมเฉลี่ยในแต่ละเม็ดลูกบิดเท่ากับ 1.27 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อเม็ดและมีผลรวมสะสมของการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินเฉลี่ยเท่ากับ 20.91 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อเม็ดและสามารถปลดปล่อยยาได้ 5.97 ± 0.03 % (mean $\pm$ S.D) (ตารางที่ 4)

1.3 ศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นของยาแตกต่างกัน

การศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นของยาแตกต่างกัน พบว่า กลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1.0 กรัมสามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินปริมาณที่สูงสุดและปล่อยยาได้เป็นระยะเวลา 8 วัน สำหรับกลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 0.5 และ 0.25 กรัมปล่อยยาได้ปริมาณน้อยกว่าตามลำดับ และกลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 0.5 และ 0.25 กรัมสามารถปล่อยยาได้เพียง 6 วัน จึงทำการศึกษาได้แค่ระยะเวลา 6 วัน ดังภาพที่ 14 เนื่องจากวันที่ 7 และ 8 เม็ดลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตปนละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโคลนจึงไม่สามารถทำการศึกษาต่อไปได้และเมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าปริมาณยาปฏิชีวนะมีผลทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 และนำผลค่าเฉลี่ยทั้ง 5 ชั่วโมงที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ในแต่ละชั่วโมงไม่มีผลทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (ภาพที่ 16)

สำหรับกลุ่มลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยา 2.0 กรัมสามารถปลดปล่อยยาในปริมาณที่สูงกว่ากลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1.0 กรัมและลูกบิดทั้ง 2 ชนิดสามารถปลดปล่อยยาได้เป็นระยะเวลานาน 8 วัน (ตารางที่ 3 และภาพที่ 14) และเมื่อนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) พบว่าปริมาณยาปฏิชีวนะมีผลทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 จากนั้นนำผลปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาจากลูกบิดยาปฏิชีวนะทั้ง 5 ชั่วโมงที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ในแต่ละชั่วโมงไม่มีผลทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 (ภาพที่ 17)

ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 0.25 และ 0.5 กรัม สามารถปล่อยยาเป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 6 วันสามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลิน โดยมีผลรวมสะสมของการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินเฉลี่ยเท่ากับ 7.39 ± 0.01 และ 14.78 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อเม็ด ตามลำดับและสามารถปลดปล่อยยาได้ 32.69 ± 0.27 และ 35.85 ± 2.03 % (mean $\pm$ S.D) ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

สำหรับลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 2 กรัม สามารถปล่อยยาในระยะเวลาทั้งสิ้น 8 วันสามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลิน โดยมีผลรวมสะสมของการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินเฉลี่ยเท่ากับ 44.96 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อเม็ด และสามารถปลดปล่อยยาได้ $29.41 \pm 0.21\%$ (mean $\pm$ S.D) (ตารางที่ 4)

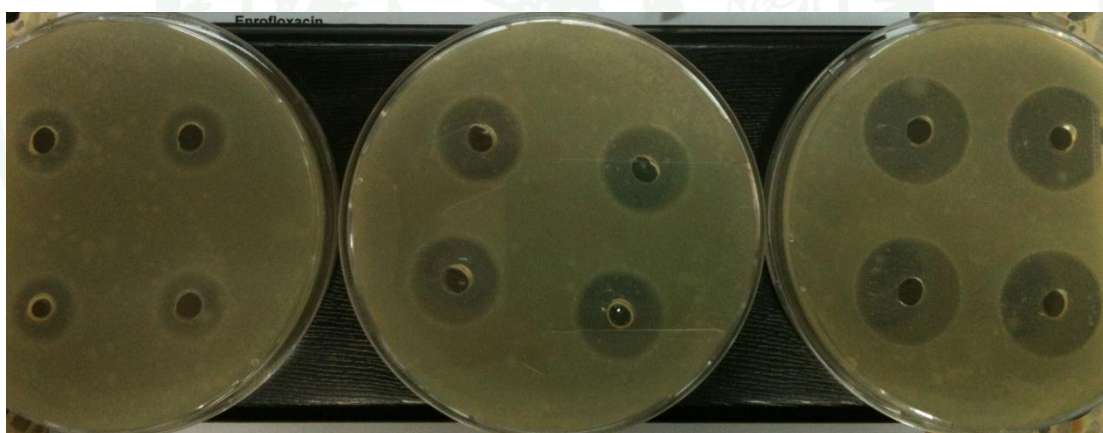
เมื่อนำผลของปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมาจากลูกบิดยาปฏิชีวนะที่ได้ทั้ง 5 กลุ่มการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปัจจัยสำคัญทั้ง 2 ปัจจัยคือ ปริมาณยาและวัสดุที่ใช้ทำลูกบิดยาปฏิชีวนะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้ปริมาณการปลดปล่อยยาจากลูกบิดเกิดความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 (ภาพที่ 15) หลังจากทำการทดสอบพบว่ากลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 0.25, 0.5 และ 1 กรัมมีน้ำหนักลูกบิดที่หายเฉลี่ยในแต่ละเม็ดลูกบิดเท่ากับ 23.96 ± 2.74 , 5.24 ± 2.14 และ $9.91 \pm 1.46\%$ (mean $\pm$ S.D) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 และ 2 กรัม มีน้ำหนักลูกบิดที่หายเฉลี่ยในแต่ละเม็ดลูกบิดเท่ากับ 7.02 ± 1.02 และ $9.15 \pm 1.12\%$ ตามลำดับ

1.4 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของยาเซฟฟาโซลิน

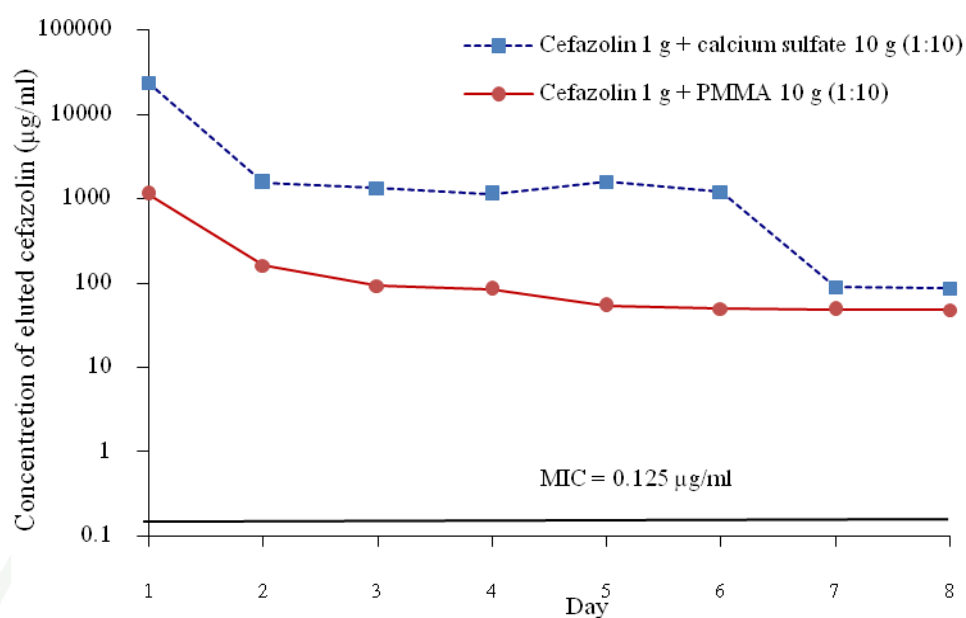
ในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของยาเซฟฟาโซลินพบว่า ค่า MIC ของยาเซฟฟาโซลินต่อเชื้อแบคทีเรียคือ *S. aureus* (TISTR 517) คือ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) (ภาพที่ 14)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Average) ของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน($\mu\text{g/ml}$) ที่ปลดปล่อยจาก
 ลูกบิดยาปฏิชีวนะระหว่างกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต (1:10) กับ
 กลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอ (1:10) ในระยะเวลา 8 วัน

Day	Cef-calcium sulfate bead ($\mu\text{g/ml}$)	Cef-PMMA bead ($\mu\text{g/ml}$)
1	$23,432.43 \pm 352.14$	$1,126.89 \pm 7.87$
2	$1,555.35 \pm 24.37$	159.93 ± 0.94
3	$1,320.41 \pm 13.24$	91.61 ± 0.55
4	$1,125.19 \pm 6.81$	84.73 ± 0.62
5	$1,580.54 \pm 18.91$	53.44 ± 0.31
6	$1,191.52 \pm 11.88$	49.41 ± 0.58
7	88.80 ± 0.41	48.74 ± 0.40
8	86.35 ± 0.49	48.08 ± 0.27



ภาพที่ 12 ผลการทดสอบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตโดยใช้วิธี
 วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาโดยแต่ละถาดความเข้มข้นยาแตกต่างกันคือ ถาดที่ 1 กลุ่มของ
 ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต (0.25:10) ถาดที่ 2 กลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟา
 โซลินแคลเซียมซัลเฟต (0.5:10) และถาดที่ 3 กลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียม
 ซัลเฟต (1:10) (จากซ้ายไปขวา)

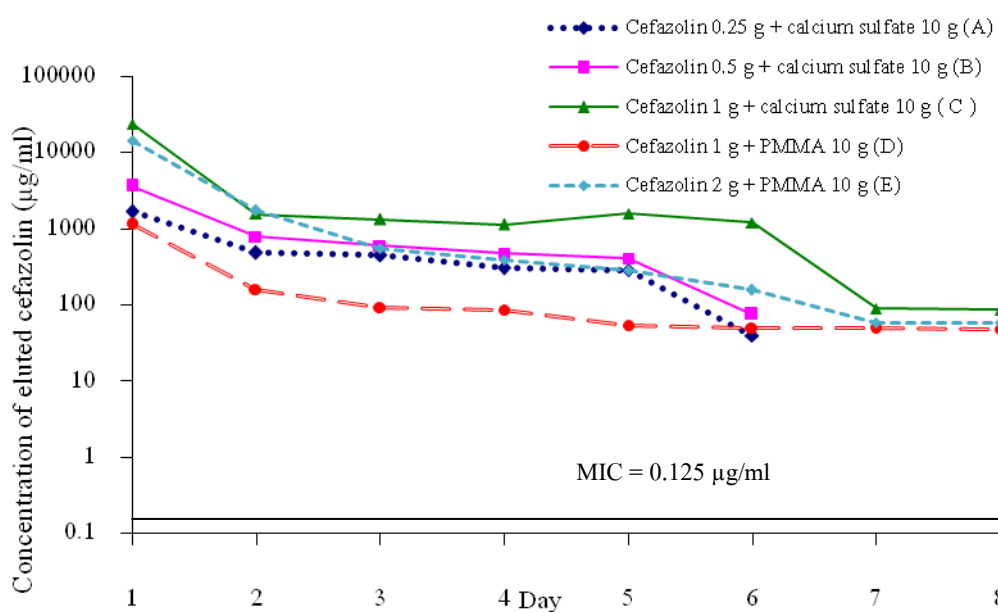


ภาพที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ย (Average) ของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน ($\mu\text{g/ml}$) ที่ปลดปล่อยจากลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต (1:10) และกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอ (1:10) ในระยะเวลา 8 วันและค่า MIC สำหรับ *Staphylococcus aureus* (TISTR 517) คือ 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)

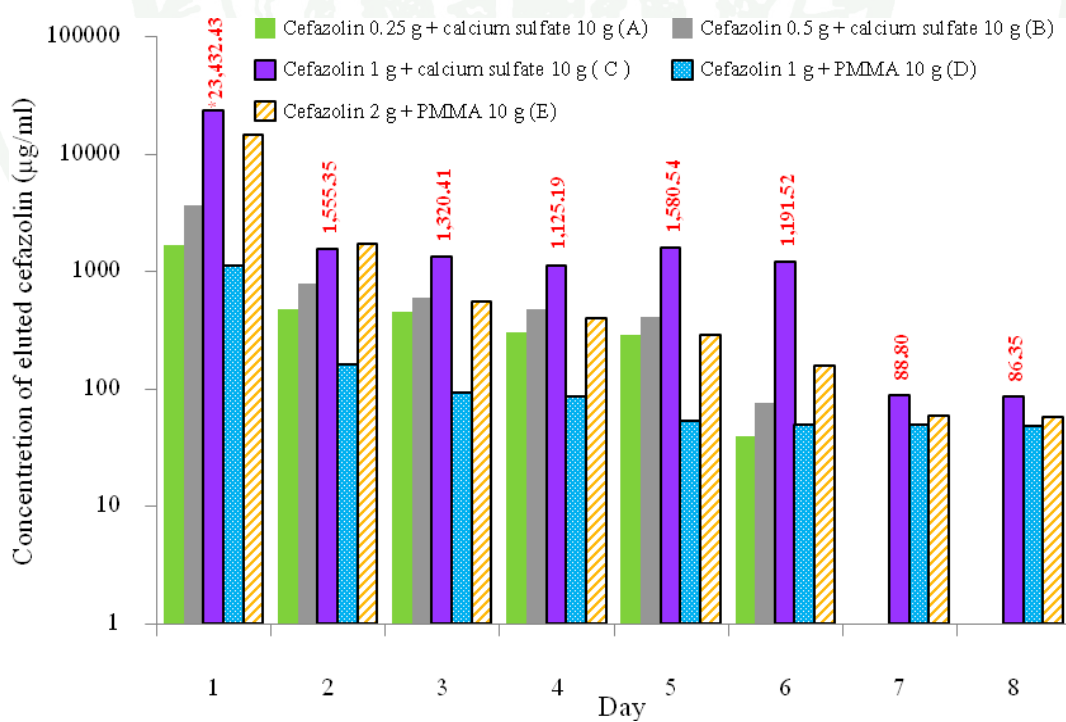
ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Average) ของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน ($\mu\text{g/ml}$) ที่ปลดปล่อยจากกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตและกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกัน ในระยะเวลา 8 วัน

Day	Cefazolin 0.25 g + calcium sulfate 10 g (A)	Cefazolin 0.5 g + calcium sulfate 10 g (B)	Cefazolin 1 g + calcium sulfate 10 g (C)	Cefazolin 1g + PMMA 10 g (D)	Cefazolin 2 g + PMMA 10 g (E)
1	$1,670.68 \pm 23.83$	$4,304.61 \pm 52.64$	$23,432.43 \pm 352.14$	$1,126.89 \pm 7.87$	$14,404.07 \pm 134.27$
2	478.59 ± 3.82	$1,002.83 \pm 8.71$	$1,555.35 \pm 24.37$	159.93 ± 0.94	$1,727.25 \pm 15.69$
3	448.82 ± 4.09	780.25 ± 9.14	$1,320.41 \pm 13.24$	91.61 ± 0.55	547.30 ± 6.35
4	303.47 ± 3.50	446.26 ± 4.33	$1,125.19 \pm 6.81$	84.73 ± 0.62	392.26 ± 3.41
5	284.27 ± 3.06	266.16 ± 3.67	$1,580.54 \pm 18.61$	53.44 ± 0.31	284.41 ± 2.60
6	39.66 ± 0.48	97.53 ± 1.02	$1,191.52 \pm 11.88$	49.41 ± 0.58	156.86 ± 1.42
7	n/d	n/d	88.80 ± 0.41	48.74 ± 0.40	58.48 ± 0.37
8	n/d	n/d	86.35 ± 0.49	48.08 ± 0.27	57.20 ± 0.61

หมายเหตุ: n/d = ไม่สามารถตรวจได้



ภาพที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน($\mu\text{g/ml}$)ที่ปลดปล่อยจากลูกปิดแคลเซียมซัลเฟตและลูกปิดพีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกันและค่า MIC สำหรับ *S.aureus* (TISTR 517) คือ 0.125 $\mu\text{g/ml}$

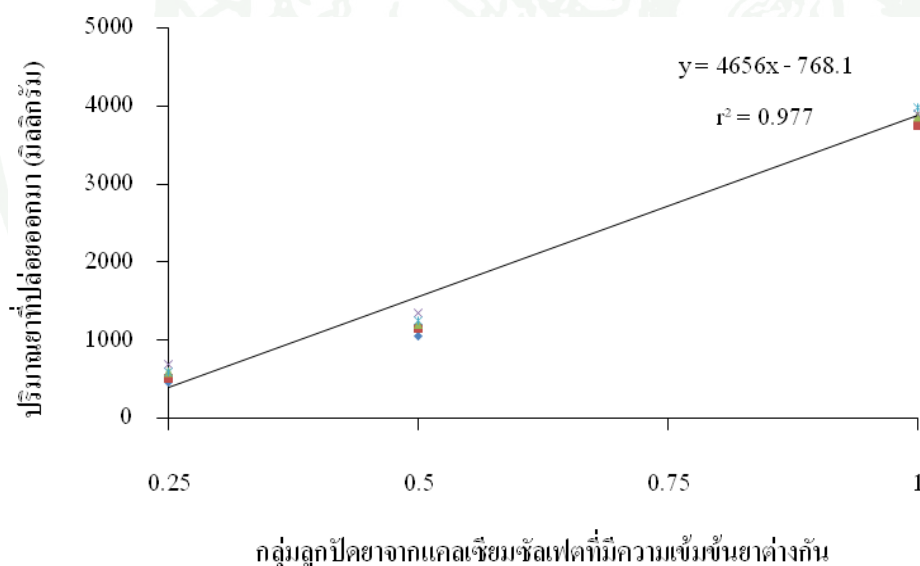


ภาพที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลิน($\mu\text{g/ml}$)ที่ปลดปล่อยจากลูกปิดแคลเซียมซัลเฟตและลูกปิดพีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกัน

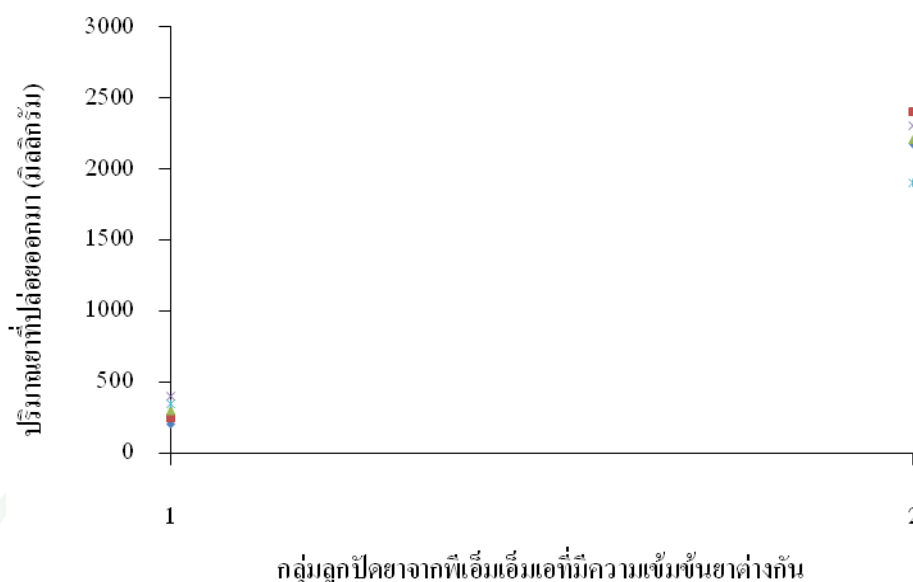
ตารางที่ 4 ผลรวมสะสมของการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากกลุ่มลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตและกลุ่มลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกัน

Group	Percent of cumulative eluted cefazolin	Cumulative eluted cefazolin (mg/bead)
Cefazolin 0.25g+ calcium sulfate 10g *	32.69±0.27	7.39±0.01
Cefazolin 0.5g+ calcium sulfate 10g *	35.85±2.03	14.78±0.02
Cefazolin 1g+ calcium sulfate 10g **	75.95±0.88	30.02±0.17
Cefazolin 1g+ PMMA 10 g **	5.97±0.03	20.91±0.11
Cefazolin 2g+ PMMA 10 g **	29.41±0.21	44.96±0.12

หมายเหตุ: * 6 วัน, ** 8 วัน



ภาพที่ 16 แสดงค่าปริมาณยา (mg/bead) ที่ปลดปล่อยจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินต่างกันทั้ง 5 ชั่วโมง



ภาพที่ 17 แสดงค่าปริมาณยา(mg/bead)ที่ปลดปล่อยจากลูกปัดพีอีเอ็มเอที่มีความเข้มข้นยาเซฟฟาลอซาลินต่างกันทั้ง 5 ซ้ำ

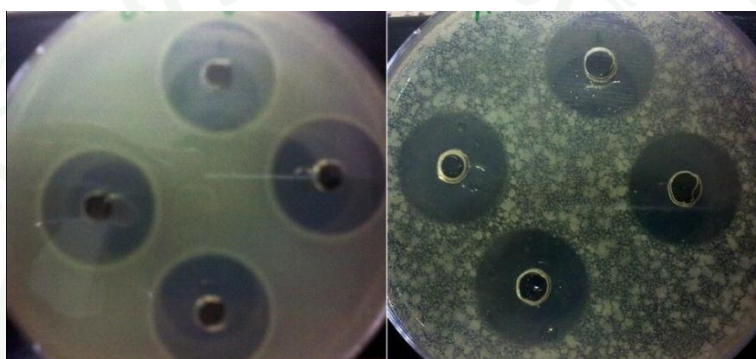
2. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์ของ *B. subtilis* เป็นระยะเวลา 1 ปี

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์ของ *B. subtilis* เป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่าเขตการยับยั้งการเจริญ(inhibition zone) ของสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* (TISTR 008) ทำการวัดโดยใช้ไม้บรรทัดวัดอย่างละเอียด (vernier) ซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร กลุ่มเอนโรฟลอกซาซินมีเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่กว้างกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเจนด้ามยจีน และพบว่าเมื่อนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) โดยใช้ค่าลอการิทึมความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ กลุ่มยาปฏิชีวนะทั้งสองได้แก่ เอนโรฟลอกซาซิน และเจนด้ามยจีน ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ ค่าเขตการยับยั้งการเจริญเติบโตของสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียสมีค่าใกล้เคียงกับ 1 ทั้ง 12 เดือน (ตารางที่ 5 และ 6)

ในการตรวจวัดระดับของยาเอนโรฟลอกซาซินและยาเจนด้ามยจีนโดยใช้เชื้อแบคทีเรียคือ *B. subtilis* (TISTR 008) พบว่า ผลตรวจระดับต่ำสุด (lower limit of detection) ของยาเอนโรฟลอกซาซินและยาเจนด้ามยจีนต่อเชื้อ *B. subtilis* คือ 0.25 และ 0.5 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

หลังจากเก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ได้ 8 เดือนพบว่า ความเป็นเนื้อเดียวกันของสปอร์กลุ่มที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมากกว่ากลุ่มที่เก็บในอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 18)

เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Factorial in RCBD พบว่า ปัจจัยสองปัจจัยคือ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 12 เดือน เป็นปัจจัยสำคัญมีผลทำให้เกิดความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05



ภาพที่ 18 การตรวจโดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของยาเอนโรฟลอกซาซินโดยใช้สปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* (TISTR 008) ที่เก็บนาน 8 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส(ซ้าย) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) (ขวา)

ตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ของเส้นตรงมาตรฐานของยา
เอนโรฟลอกซาซินโดยใช้สปอร์ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง
(25-30 องศาเซลเซียส)

เดือน	4°C		อุณหภูมิห้อง (25-30°C)	
	สมการเส้นตรง	r^2	สมการเส้นตรง	r^2
1	$y = 15.45x + 21.43$	0.998	$y = 11.95x + 20.74$	0.996
2	$y = 8.165x + 27.20$	0.821	$y = 8.752x + 27.31$	0.900
3	$y = 17.01x + 23.28$	0.997	$y = 15.68x + 22.40$	0.988
4	$y = 11.19x + 27.08$	0.913	$y = 12.19x + 27.68$	0.948
5	$y = 12.16x + 21.16$	0.986	$y = 12.18x + 20.29$	0.998
6	$y = 13.11x + 21.24$	0.989	$y = 13.19x + 21.38$	0.978
7	$y = 17.78x + 17.48$	0.962	$y = 16.90x + 18.20$	0.979
8	$y = 12.48x + 21.09$	0.998	$y = 13.28x + 20.83$	0.998
9	$y = 7.298x + 16.71$	0.994	$y = 13.17x + 20.37$	0.990
10	$y = 14.04x + 20.96$	0.992	$y = 14.30x + 20.60$	0.991
11	$y = 14.22x + 20.14$	0.997	$y = 11.42x + 20.38$	0.990
12	$y = 9.699x + 17.44$	0.996	$y = 13.41x + 20.21$	0.992

หมายเหตุ: x = log concentration of antimicrobials (ppm), y = clear zone (mm)

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ของเส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซิน โดยใช้สปอร์ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

เดือน	4°C		อุณหภูมิห้อง (25-30°C)	
	สมการเส้นตรง	r^2	สมการเส้นตรง	r^2
1	$y = 6.934x + 12.62$	0.964	$y = 5.440x + 12.44$	0.915
2	$y = 4.820x + 14.20$	0.995	$y = 4.300x + 14.29$	0.951
3	$y = 7.431x + 14.93$	0.956	$y = 7.762x + 14.04$	0.955
4	$y = 4.086x + 12.93$	0.968	$y = 4.720x + 13.17$	0.989
5	$y = 4.917x + 13.80$	0.938	$y = 5.051x + 12.93$	0.977
6	$y = 2.287x + 11.90$	0.991	$y = 3.359x + 11.92$	0.999
7	$y = 3.564x + 12.77$	0.992	$y = 6.351x + 12.92$	0.997
8	$y = 3.899x + 16.32$	0.991	$y = 5.115x + 16.73$	0.998
9	$y = 4.094x + 16.36$	0.997	$y = 5.198x + 16.68$	0.998
10	$y = 8.370x + 14.08$	0.991	$y = 4.966x + 12.09$	0.998
11	$y = 10.60x + 12.53$	0.993	$y = 9.402x + 12.33$	0.994
12	$y = 7.777x + 11.78$	0.992	$y = 7.576x + 12.87$	0.991

หมายเหตุ: x = log concentration of antimicrobials (ppm), y = clear zone (mm)

วิจารณ์

1. ศึกษาการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกปัดเคลือบเซลล์และลูกปัดโพลีเมทิลเมทาไครเลต (พีเอ็มเอ็มเอ)

1.1 การเตรียมลูกปัดยาเซฟฟาโซลินจากเคลือบเซลล์และโพลีเมทิลเมทาไครเลต (พีเอ็มเอ็มเอ) ที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางคลินิก (commercial formulation)

จากการเตรียมลูกปัดยาเซฟฟาโซลิน-เคลือบเซลล์โดยใช้ปริมาณยาเซฟฟาโซลินที่ 1 กรัม ใช้เคลือบเซลล์กลุ่มละ 10 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงไปคนให้เข้ากันสำหรับลูกปัดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ใช้ปริมาณยาเซฟฟาโซลินที่ 1 กรัม ผสมกับพีเอ็มเอ็มเอกลุ่มละ 10 กรัม โดยเติมสารละลายโมโนเมอร์ (monomer) 4.5 มิลลิลิตร ลงไปคนให้

เข้ากัน จากนั้นนำไปเทใส่แบบหล่อซิลิโคนทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วแกะออกจากแบบหล่อโดยนำลูกบิดยาปฏิชีวนะผ่านกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้วิธีการอบแก๊ส (gas sterilization) (Udomkusonsri *et al.*, 2008) โดยใช้แก๊สเอทิลีนออกไซด์ (EO) อย่างไรก็ตามการเตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะในครั้งนี้พบว่า มีข้อแตกต่างจากการเตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะของ Udomkusonsri *et al.* (2008) ที่เตรียมลูกบิดจากแคลเซียมซัลเฟต โดยใช้ยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัม ผสมกับแคลเซียมซัลเฟต 10 กรัม ซึ่งเติมน้ำกลั่น 4.5 มิลลิลิตร ลงไปคนให้เข้ากัน และเตรียมลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัม ผสมกับพีเอ็มเอ็มเอ 10 กรัม แล้วเติมสารละลายโมโนเมอร์ 3.5 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาการปลดปล่อยยาและระยะเวลาในการทดลอง ทั้งนี้สามารถเปรียบเทียบผลการทดลองดังกล่าวได้

1.2 ศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตและโพลีเมทิลเมทาไครเลต (พีเอ็มเอ็มเอ)

โดยเมื่อนำผลปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอ พบว่า ลูกบิดยาเซฟฟาโซลินทำจากวัสดุทั้งสองชนิด สามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้ระยะเวลา 8 วันเท่ากัน และในวันที่ 1 มีการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้ระดับสูง เพราะมีการปลดปล่อยยาจากพื้นที่ผิวหน้าของลูกบิดยา (surface area) และวันที่ 2-8 มีการปลดปล่อยยาได้ในระดับต่ำลงมา เนื่องจากความเข้มข้นยาที่ปล่อยจะออกมาจากภายในลูกบิดยา และพบว่า ลูกบิดจากแคลเซียมซัลเฟตสามารถปลดปล่อยยาได้มากกว่าเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลูกบิดจากพีเอ็มเอ็มเอ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 14) เพราะแคลเซียมซัลเฟตมีความพรุนมากกว่าและมีคุณสมบัติที่สามารถดูดซึมกลับ อีกทั้งฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลนจะช่วยในการละลายตัวของแคลเซียมซัลเฟตและเกลือ (sodium) ได้ดี เพราะการทดลองครั้งนี้ใช้ยาเซฟฟาโซลินชนิดผงสำหรับฉีด ซึ่งจะมีเกลือเป็นส่วนประกอบ ส่วนพีเอ็มเอ็มเอมีคุณสมบัติและข้อจำกัดในการใช้ โดยพีเอ็มเอ็มเอจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการดูดซึมกลับ (non-resorbable) อีกทั้งในขณะขึ้นรูป (polymerization) จะเกิดความร้อนขึ้นแต่ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอมีความสามารถในการคงตัวอยู่ได้นานกว่าและไม่สามารถละลายตัวได้ จึงเป็นข้อเสียที่ต้องมีการผ่าตัดเอาออกจากร่างกายหลังจากการรักษาเสร็จสิ้น ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดข้อจำกัดในการใช้ จึงส่งผลทำให้ลูกบิดจากแคลเซียมซัลเฟตมีการปล่อยออกมาได้ดีกว่าลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอ หากใช้ควรพิจารณาคุณสมบัติของยาปฏิชีวนะ เพื่อป้องกันการเสื่อมคุณภาพของยาที่ใช้

จากการศึกษาของ Seeley *et al.* (2003) และ Zalavras *et al.* (2004) พบว่า ลูกบิดยาปฏิชีวนะจากพีเอ็มเอ็มเอมีการปลดปล่อยได้ระดับสูงในวันแรกและในวันต่อ ๆ มา จะมีการปลดปล่อย

ยาจากลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอได้ในระดับลดลงเรื่อยๆและมีอุณหภูมิที่สูงมากในขณะขึ้นรูป ทำให้มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการใช้เตรียมลูกบิดยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้ในการรักษาการติดเชื้อเฉพาะที่ (Buchholz *et al.*, 1981) และรักษาโรคทางกระดูก (Klemm *et al.*, 1993) และพบรายงานการศึกษาของ Jiranek *et al.* (2006) พบว่า ลูกบิดยาปฏิชีวนะที่เตรียมจากพีเอ็มเอ็มเอสามารถปล่อยยาออกจากลูกบิดยาปฏิชีวนะได้ และมีข้อจำกัดในเรื่องการใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับเตรียมทำลูกบิดยาปฏิชีวนะจากพีเอ็มเอ็มเอ

1.3 ศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตที่เตรียมจากยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นของยาแตกต่างกัน

เมื่อนำลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตที่มีปริมาณของยาเซฟฟาโซลินที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 0.25, 0.5 และ 1 กรัม ตามลำดับ ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัม สามารถปลดปล่อยยาได้มากกว่ากลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 0.5 และ 0.25 กรัม และสามารถปลดปล่อยได้ในระยะเวลา 6 วัน ดังภาพที่ 14 เนื่องจากฟอสเฟตบัพเฟอร์ชาไลน์สามารถช่วยในการละลายตัวของแคลเซียมซัลเฟตได้ดี จึงทำให้กลุ่มลูกบิดที่มีปริมาณยา 0.25 และ 0.5 กรัมแตกตัวได้สูง เพราะในลูกบิดยามีแคลเซียมซัลเฟตค่อนข้างสูง ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างสารละลายในวันที่ 7 และ 8 เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบได้

จากการศึกษาการปลดปล่อยยาออกจากลูกบิดยาปฏิชีวนะ พบว่า กลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัม มีเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกจากลูกบิดยาปฏิชีวนะได้มากที่สุด และกลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 0.5 กรัมมีเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินตามลงมา ส่วนกลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 0.25 กรัมมีเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินน้อยสุดในกลุ่มที่ใช้แคลเซียมซัลเฟตเป็นวัสดุทางการแพทย์ในการทำลูกบิดยาปฏิชีวนะ ดังแสดงในตารางที่ 4 และวันที่ 1 มีการปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้มาก เพราะยาเซฟฟาโซลินที่อยู่บริเวณผิวหน้าของลูกบิดยาจะละลายมากับฟอสเฟตบัพเฟอร์ชาไลน์ ทำให้ในวันที่ 2-8 จะปลดปล่อยยาน้อยกว่าวันที่ 1 เพราะยาจะต้องปล่อยออกมาจากภายในลูกบิดยา

หลังจากการศึกษาการปลดปล่อยยาจากลูกบิดยาปฏิชีวนะที่เตรียมจากความเข้มข้นของยาที่แตกต่างกัน พบว่า การปลดปล่อยยาจากลูกบิดยาปฏิชีวนะได้ในระดับสูง จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยา (Henry *et al.*, 1995) หากมีความเข้มข้นยาที่สูงจะสามารถที่ปลดปล่อยยาออกมาได้

ในระดับที่สูงตาม แต่หากใช้ความเข้มข้นของยาที่ต่ำก็จะปลดปล่อยยาออกมาได้ในระดับที่ต่ำๆ ในการใช้ยาปฏิชีวนะจะต้องพิจารณาความเป็นพิษที่จะเกิดตามมาจากการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณนั้น (Neut *et al.*, 2001) ที่อาจก่อให้เกิดผลเสียได้ และสาเหตุที่ทำให้เกิดการละลายตัว เพราะแคลเซียมมีคุณสมบัติจัดอยู่ในกลุ่มที่มีการละลายตัวได้ (Strocchi *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2003)

นอกจากนี้สำหรับลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 และ 2 กรัม นั้น พบว่า ลูกบิดยาที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 2 กรัมสามารถที่จะปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้ในระดับสูงเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัม และสามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินออกจากลูกบิดยาปฏิชีวนะได้ระยะเวลาจนถึง 8 วัน โดยไม่มีการแตกตัวของพีเอ็มเอ็มเอปนออกมาในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาไลน์ (ภาพที่ 14) และเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยยาออกจากลูกบิดยาปฏิชีวนะ พบว่า จะปลดปล่อยยาออกมาได้มากกว่ากลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัม ดังตารางที่ 4

ในส่วนของกลุ่มลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลินที่แตกต่างกัน โดยดูจาก 5 ซ้ำ พบว่า ซ้ำ ไม่เป็นผลทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 และเมื่อหาความสัมพันธ์เส้นตรงมาตรฐาน พบว่าค่า r^2 จะได้เท่ากับ 0.97 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ 1 เป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ เพื่อความแม่นยำในการทดลองครั้งนี้ ดังแสดงในภาพที่ 16

สำหรับกลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลินที่แตกต่างกัน พบว่าซ้ำไม่เป็นปัจจัยทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ดังแสดงในภาพที่ 17 ไม่สามารถทำการลากเส้นตรงมาตรฐานได้ เนื่องจากกลุ่มการทดลองในกลุ่มที่ใช้พีเอ็มเอ็มเอมีเพียง 2 กลุ่มการทดลอง จึงไม่สามารถลากเส้นตรงมาตรฐานได้ สำหรับการลากเส้นตรงมาตรฐานนั้นกลุ่มการทดลองต้องมีมากกว่า 2 กลุ่มการทดลอง

หากนำผลปริมาณการปลดปล่อยยาจากลูกบิดยาปฏิชีวนะมาเปรียบเทียบทั้งหมดทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งมีทั้งหมด 5 กลุ่ม ที่ได้จากวัสดุทางการแพทย์ที่แตกต่างกันและมีความเข้มข้นของยาเซฟฟาโซลินที่แตกต่างกันโดยเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างวัสดุทางการแพทย์ที่ใช้ทำลูกบิดยาปฏิชีวนะคือ กลุ่มแคลเซียมซัลเฟตกับกลุ่มพีเอ็มเอ็มเอ พบว่า กลุ่มที่ใช้แคลเซียมซัลเฟตทำลูกบิดยาปฏิชีวนะ มีความสามารถในการปลดปล่อยยาออกจากลูกบิดได้ดีกว่ากลุ่มลูกบิดยาปฏิชีวนะที่ทำจากพีเอ็มเอ็มเอ เพราะว่า ลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตมีความเป็นรูพรุนมากกว่าพีเอ็มเอ็มเอ

(Frutos *et al.*, 2002) ส่วนลูกปัดจากพีเอ็มเอ็มเอมีคุณสมบัติไม่มีการดูดซึมกลับและมีความแข็งของลูกปัดมากทำให้ยาแทรกตัวได้ต่ำการปลดปล่อยยาจึงใช้เวลานาน ทำให้ลูกปัดจากพีเอ็มเอ็มเอมีการปลดปล่อยยาได้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน

ถึงแม้ว่าลูกปัดทำจากแคลเซียมซัลเฟตจะใช้ยาเซฟฟาโซลินที่มีปริมาณยาในระดับต่ำๆ คือ 0.25 กรัม ก็สามารถที่จะปลดปล่อยออกมาได้ในระดับที่สูงกว่าลูกปัดที่ทำจากพีเอ็มเอ็มเอ ดังตารางที่ 4 แต่การคงรูปนั้นไม่สามารถที่จะคงรูปได้นานจนถึงครบระยะเวลาการทดลอง 8 วัน เนื่องด้วยแคลเซียมซัลเฟตนั้น มีคุณสมบัติดูดซึมกลับได้ โดยไม่จำเป็นต้องมีการนำออกจากร่างกายเหมือนลูกปัดที่ทำจากพีเอ็มเอ็มเอ และแคลเซียมซัลเฟตไม่เกิดไอความร้อนในขณะที่ขึ้นรูปเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอ็มเอ็มเอ ซึ่งพีเอ็มเอ็มเอจะมีความร้อนที่เกิดขึ้น อาจจะเป็นข้อจำกัดในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะเพราะยาปฏิชีวนะบางชนิดไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ (Sanicola and Albert, 2005)

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีการที่เรียกว่า การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของยาเซฟฟาโซลินที่แตกต่างกัน และการใช้วัสดุทางการแพทย์ที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลโดยใช้วิธี *microbioassay* ในการทดสอบ ทำให้เกิดความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 และนำมาเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของทั้ง 5 กลุ่ม พบว่า มีความแตกต่างกันทั้ง 5 กลุ่มซึ่งในกลุ่มแรกจะเกิดความแตกต่างกับกลุ่มที่ 2, 3, 4 และ 5 ส่วนกลุ่มที่ 2 มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ 1, 3, 4 และ 5 โดยเฉพาะกับกลุ่มที่ 1 จะมีความแตกต่างกันมาก ในกลุ่มที่ 3 มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ 1, 2, 4 และ 5 ซึ่งกลุ่มที่ 1 และ 5 จะมีความแตกต่างกันมาก สำหรับในกลุ่มที่ 4 มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 5 โดยกลุ่มที่ 1 และ 5 พบความแตกต่างกันมาก ส่วนกลุ่มที่ 5 จะมีความแตกต่างกับกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งกลุ่มที่ 1, 3 และ 4 นั้นจะมีความแตกต่างกันมากที่สุด เมื่อนำมาเปรียบเทียบทั้ง 5 กลุ่มพบว่า ความเข้มข้นของยาและวัสดุทางการแพทย์เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการปล่อยยาจากลูกปัดยา ทำให้เกิดความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05

1.4 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของยาเซฟฟาโซลิน

เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ของยาเซฟฟาโซลิน โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* (TISTR 517) เป็นตัวทดสอบ พบว่าค่า

ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ได้คือ 0.125 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรและพบรายงานที่สอดคล้องกันโดย Udomkusonsri *et al.* (2011) ซึ่งมีค่าที่สูงกว่าค่าระดับความเข้มข้นของยาที่ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) (ภาพที่ 14)

ดังนั้นการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินรูปของยานี้จากลูกบิดเคลือบเซรามิคและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอควรมีค่าสูงกว่าค่า MIC และควรใช้ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-เคลือบเซรามิคเพราะว่าเคลือบเซรามิคเป็นวัสดุทางการแพทย์ที่ย่อยสลายได้และไม่เกิดไอของความร้อนขึ้นสามารถดูดซึมกลับเข้าสู่ร่างกายได้ มีความพรุนมากที่ทำให้ยาสามารถแทรกตัวหรือปล่อยออกจากลูกบิดยาได้สูง ทำให้ปริมาณยาที่ใช้ในการเตรียมลูกบิดยานั้นไม่ต้องมีปริมาณที่สูงถึงแม้ใช้ความเข้มข้นของยาที่ปริมาตรต่ำๆ สามารถปลดปล่อยยาได้สูงกว่าลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่ต้องใช้ความเข้มข้นของยาที่ปริมาตรสูง แต่ข้อดีของการใช้พีเอ็มเอ็มเอนั้น คือ สามารถปลดปล่อยได้อย่างช้าๆ ระยะเวลาาน เมื่อปลดปล่อยเสร็จสิ้นจะต้องมีการนำออกจากร่างกาย การเลือกใช้นั้นจะต้องคำนึงถึงความเสี่ยงต่อการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้น และต้องเข้าใจถึงจุลชีววิทยาของแผล เพราะเป็น open fracture คือสามารถพบได้ทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ สำหรับการเลือกความเข้มข้นของยาจากลูกบิดยานั้น คำนึงถึงความสามารถของการออกฤทธิ์ในการตอบสนองต่อผลติดเชื้อที่เกิดขึ้นว่าเพียงพอต่อการรักษาและนานพอที่ฆ่าเชื้อได้ ทั้งนี้ต้องดูผลข้างเคียงที่จะเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะตามมา เพื่อจะส่งผลทำให้การรักษาได้ดีและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

2. การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์ของ *B. subtilis* เป็นระยะเวลา 1 ปี

ในการทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* (TISTR 008) โดยใช้วิธีการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาซึ่งแบ่งเก็บสปอร์เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เก็บในอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และอีกกลุ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา เนื่องจากมีความไวให้ผลที่รวดเร็วประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดสอบที่น้อย เชื้อในรูปสปอร์มีผนังที่หนาและสามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่ารูปขณะกำลังเจริญเติบโตและสามารถเตรียมไว้ได้อีกทั้งยังให้ค่าความชัดเจนของเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ชัดเจนกว่า จึงเป็นเหตุทำให้ในรูปสปอร์ทำลายได้ยากกว่าทั้งนี้การทดสอบจึงเลือกใช้สปอร์และอีกสาเหตุคือไม่นิยมนำเข้าเชื้อในรูปสปอร์มาในประเทศ เนื่องจากการนำเข้าจะมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง การใช้สปอร์ของเชือนั้นจะต้องมีการเตรียมใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการทดสอบประสิทธิภาพสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา เพื่อหาระยะเวลาและ

อุณหภูมิในการเก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบการตกค้างหรือสารต้านจุลชีพที่อยู่ในตัวอย่างที่ต้องการทดสอบโดยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

การทดสอบโดยใช้ยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ เอนโรฟลอกซาซินและเจนด้ามัยซินในการทดสอบสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 2 อุณหภูมิคือ อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ทดสอบทุกเดือนเป็นระยะเวลา 12 เดือน ที่ใช้ความเข้มข้นของยาเอนโรฟลอกซาซินที่ต่างกันคือ 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 และ 3.00 พีพีเอ็ม (ppm) พบว่า ความเข้มข้นที่ 3.00 มีการยับยั้งได้มากกว่ากลุ่ม 2.00, 1.00, 0.50 และ 0.25 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ซึ่งจะทำให้การวัดค่า O.D. ของสปอร์ของ *B. subtilis* ทุกเดือน และพบว่า การเก็บสปอร์ (spore) ของเชื้อ *B. subtilis* ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะมีค่า r^2 ที่ใกล้เคียงกับ 1 มากกว่าสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ที่เก็บในอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) (ตารางที่ 5) เนื่องจากในเดือนที่ 8 เริ่มพบความเปลี่ยนแปลงของโคโลนิบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรีย (seed agar) ที่กลุ่มที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีความเป็นเนื้อเดียวกันของโคโลนิมากกว่ากลุ่มที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ 18)

ในกลุ่มของยาเจนด้ามัยซินที่ใช้ความเข้มข้นที่ต่างกันคือ 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 และ 10.00 พีพีเอ็มพบว่า ความเข้มข้นที่ 10.00 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ได้กว้างกว่ากลุ่มที่มีความเข้มข้นของยาที่น้อยกว่า และในเดือนที่ 8 เริ่มสังเกตเห็นว่า กลุ่มที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 18-20 ชั่วโมง พบว่ามีความเนียนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันของโคโลนิบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียมากกว่ากลุ่มที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่าเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือเรียกว่า clear zone ของยาเอนโรฟลอกซาซินกับยาเจนด้ามัยซินพบว่า กลุ่มของยาที่ใช้เอนโรฟลอกซาซินมีการยับยั้งเชื้อได้กว้างกว่ากลุ่มของยาเจนด้ามัยซินสอดคล้องกับตารางที่ 5 และ 6 เนื่องจากว่ายาเอนโรฟลอกซาซินเป็นตัวยากลุ่มยาฟลูออโรควิโนโลนจะออกฤทธิ์ในวงกว้างคือ สามารถออกฤทธิ์ได้กับทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (Souza, M.J. et al., 2004) ทำให้ยาเอนโรฟลอกซาซินออกฤทธิ์ได้ดีกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ถึงแม้ว่าจะใช้ยาเอนโรฟลอกซาซินที่มีปริมาตรความเข้มข้นที่ต่ำเพียง 0.25 พีพีเอ็มก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ และยาเจนด้ามัยซินซึ่งเป็นตัวยาในกลุ่มยาอะมิโนกลัยโคไซด์จะออกฤทธิ์ในวงแคบคือ สามารถออกฤทธิ์ได้ดีกับแบคทีเรียแกรมลบ (Souza, et al., 2004) ส่งผลทำให้ยาเจนด้ามัยซิน

ออกฤทธิ์ได้ไม่ดีเท่าที่ควรเมื่อเทียบกับการเลือกใช้ยาเอนโรฟลอกซาซินหากจะใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ต้องใช้ในปริมาณความเข้มข้นของยาเอนด้ามยจีนที่ค่อนข้างสูงพอจึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อนำผลการทดลองรวมถึงค่าเส้นตรงมาตรฐานที่ได้ในแต่ละเดือน ทั้ง 12 เดือน วิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งใช้วิธีที่เรียกว่า Factorial in RCBD นั้น พบว่า ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์ที่แตกต่างกัน ทำให้ผลที่ได้เกิดความแตกต่างกัน จึงทำให้ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บสปอร์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ดังนั้นจากการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* พบว่า ควรเก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาไม่เกิน 12 เดือน เพราะอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บสปอร์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อสปอร์เชื้อ จะทำให้ประสิทธิภาพของสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ลดลง นอกจากนี้การทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ควรเลือกใช้อาปฏิกิริยานะและเชื้อที่นำมาเป็นตัวทดสอบ (bacteria indicator) รวมถึงรูปแบบของเชื้อ (form) ซึ่งแบคทีเรียจะแบ่งได้ 2 แบบได้แก่ ในรูปสปอร์ (spore form) หรือในรูปขณะกำลังเจริญเติบโต (vegetative form) ที่จะนำมาทดสอบให้เหมาะสมกัน และที่สำคัญควรมีการคำนึงถึงระดับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะและปริมาณในการใช้ที่เหมาะสม เพื่อเป็นแนวทางในการนำยาปฏิชีวนะไปใช้รักษาสัตว์เลี้ยงให้เกิดประโยชน์และเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการศึกษาการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดเคลือบเคลือบฟิล์มและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอ ได้ผลการทดลองโดยสรุปดังต่อไปนี้

1.1 ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-เคลือบฟิล์มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัม ในวันที่ 1 จะปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้สูง และสามารถคงตัวอยู่ได้ระยะเวลานาน 8 วัน ในขณะที่ทั้งสองคือกลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 0.5 และ 0.25 กรัมปลดปล่อยยาได้น้อยกว่าและสามารถคงตัวอยู่ได้เพียงระยะเวลา 6 วัน ในวันที่ 7 และ 8 มีการละลายตัวของเคลือบฟิล์มปนออกมา

1.2 ลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 2 กรัมสามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้มากกว่ากลุ่มที่มีปริมาณยาเซฟฟาโซลิน 1 กรัมและความคงตัวอยู่ได้ระยะเวลานาน 8 วัน

1.3 ลูกบิดยาปฏิชีวนะที่ได้จากลูกบิดเคลือบฟิล์มและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่า MIC

2. จากการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* (TISTR 008) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาได้ผลการทดลองโดยสรุปดังต่อไปนี้

2.1 สปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะให้ค่าเขตการยับยั้งเชื้อที่กว้างกว่าและสปอร์มีความเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่าเมื่อเทียบกับที่เก็บอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

2.2 กลุ่มที่ใช้ยาเอนโรฟลอกซาซินสามารถยับยั้งสปอร์ของเชื้อได้ดีกว่าถึงแม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของยาตำเมื่อนำผลมาเปรียบเทียบกับยาเจนด้ามยจีน

จากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า กลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟตสามารถปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้มากกว่ากลุ่มของลูกบิดยาเซฟฟาโซลิน-พีเอ็มเอ็มเอแม์ จะใช้ความเข้มข้นยาเซฟฟาโซลินที่น้อยกว่า เนื่องจากแคลเซียมซัลเฟตเป็นวัสดุทางการแพทย์ที่มีความพรุนที่ใหญ่กว่าและสามารถสลายตัวได้ จึงทำให้มีการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่า MIC นานพอที่จะสามารถรักษาการอักเสบและติดเชื้อของแผลได้ดี การนำสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ควรเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและไม่ควรเกิน 1 ปี จะให้ผลที่ดีกว่าการเก็บสปอร์ในอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เพราะสปอร์มีความละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่า และควรใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ในวงกว้างเพื่อที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้เหมาะสมทำให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกบิดแคลเซียมซัลเฟตและลูกบิดพีเอ็มเอ็มเอในครั้งนี้ ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับระดับความเข้มข้นของการใช้ยาเซฟฟาโซลินจากการทำลูกบิดยาปฏิชีวนะและแนวทางการใช้ที่เหมาะสมในการเลือกใช้ทางการรักษาดังนั้น ผลการทดลองที่ได้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนารูปแบบการใช้ลูกบิดยาปฏิชีวนะเพื่อนำไปใช้จริงในเชิงพาณิชย์ได้ ซึ่งยังต้องมีการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมต่อไป เช่น ความเป็นพิษต่อสัตว์และรูปแบบการใช้ที่เหมาะสม เป็นต้น

2. ในการเก็บสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสระยะเวลาไม่เกิน 1 ปี หากหลังจากนั้นไม่ควรใช้เนื่องจากประสิทธิภาพของสปอร์ที่นำมาทดสอบจะไม่ได้ผลเท่าที่ควร และควรเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมในการทดสอบกับสปอร์ของเชื้อ ทั้งนี้การเตรียมสปอร์เพื่อให้ประหยัดเวลาในการเตรียมและสามารถนำมาทดสอบได้โดยไม่จำเป็นต้องรอเวลา

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. 2553. ทะเบียนยา
สามัญสำหรับยาเดี่ยว. แหล่งที่มา: <http://www.wapp1.fda.moph.go.th/ed2547/?url>,
14 พฤษภาคม 2553.
- วรา พานิชเกรียงไกร. 2551. การใช้ยา A to Z สำหรับสัตวแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 4. โรงพิมพ์ทวีโชติ
การพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- สุชาดา ชูติมาวรรณ, โปยม วงศ์วรวิทย์ และ อภิญญา เหมะจุฑา. 2550. คู่มือทักษะตามเกณฑ์
ความรู้ความสามารถทางวิชาชีพของผู้ประกอบวิชาชีพเภสัชกรรม. สภาเภสัชกรรม,
กรุงเทพฯ .
- ศิวาพร ศิวาเวช. 2542. การศึกษาปริมาณการดูดซึมของยา. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีการอาหารคณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Adams, K., L. Couch., G. Cierny, J. Calhoun. and J.T. Mader. 1992. In vitro and in vivo
evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate
beads. **Clin Ortho.** 278:244-252.
- Adriano, W.S., V. Veredas, C.C. Santana, and L.R.B. Goncalves. 2005. Absorption of
amoxicillin on chitosan beads: Kinetics, equilibrium and validation of finite bath models.
Biochemical Engineering Journal. 27:132-137.
- Anal, A.K. and W.F. Stevens. 2005. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of
ampicillin. **Int. J. Pharm.** 290:45-54.
- Brause, B.D. 2005. Infection with prostheses in bones and joints. In Mandell, G.L., J.E. Bennett,
R. Dolin R.eds. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious
diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2005: 1332-7.

Buchholz, H.W. and H. Engelbrecht. 1970. Depot effects of various antibiotics mixed with palaces resins. **Chirorg.** 41:511-515.

Buchholz, H.W., Elson, R.A., Engelbrecht, E., Lodenkamper, H., Rottger, J., Siegel, A. 1981. Manegement of deep infection of total hip replacement. **J Bone Joint Surg Br.** 63:342-53.

Buchholz, H.W. and R.A. Elson. 1984. Antibiotic-loaded acrylic cement: current concepts. **Clin Orthop Relat Res.** 190:96-108.

Bunmanee, K., T. Juanpanich, K. Vichukit, W. Wongwandhangoo, S. Phochantachinda, P. Sanyathitiseree and P. Udomkusonsri. 2009. In vitro elution characteristics of gentamicin and enrofloxacin from polymethylmethacrylate and calcium sulfate bead. **The 47th KasetsartUniversity Annual Conference.**252-259.

Clinical and Laboratory Standards Institue. 2006. M7-A7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-Seven Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2006: Wayne, PA.

Chambers, H.F. 2001. Beta-lactam antibiotics and other inhibitors of cell wall synthesis. *In* Katzung BG, ed. **Basic & clinical pharmacology**. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.

Diefenbeck, M., T. Muckley and G.O. Hofmann. 2006. Prophylaxiss and treatment of implant related infections by local application of antibiotics. **Injury, Int. J. Care injured.** 37:S95-S104.

Ficker, L., T.A. Meredith, S. Gardner and L.A. Wilson. 1990. Cefazolin levels after intravenous injection. **Invest Ophtalmol Vis Sci.** 31: 502-505.

- Frutos, P., E. Diez-Pena, G. Frutos, and J.M. 2002. Barrales-Rienda. Release of gentamicin sulfate from a modified commercial bone cement. Effect of (2-hydroxyethyl methacrylate) comonomer and poly (*N*-vinyl-2-pyrrolidone) additive on release mechanism and kinetics. **Biomaterials**. 23:3787-3797.
- Garrett, G.H. and C.M. Grisham. 1999. **Biochemistry**, 2nd Edition. Saunders College Publishing, USA.
- Gilbert, D.N. 2005. Aminoglycosides. In Mandell, G.L., J.E. Bennett, and R. Dolin. eds. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2005: 328-56.
- Henry, S.L. and K.P. Galloway. 1995. Local antibacterial therapy for the management of orthopaedic infection: Pharmacokinetic considerations. **Clin Pharmacokinet**. 29:36-45.
- Hanssen, A.D. 2004. Prophylactic use of antibiotic bone cement: An emerging standard-In opposition. **J. Arthro**. 19(4):73-77.
- Harcourt, B. and F. Abscess. 2002. In Textbook of Rabbit Medicine. **Butterworth-Heinemann, Oxford**.
- Hewitt, W. 2004. **Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach** Interpharm. 97-115.
- Holman, W.L., R.J. Fix, B.A. Foley, D.C. McGiffin, B.K. Rayburn and J.K. Kirklin. 1999. Management of wound and left ventricular assist device pocket infection. **Ann Thorac Surg**. 68:1080-1082.
- Klemm, K. 1979. Gentamicin PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections (author's transl) **Zentralbl Chir**. 104(14): 934-942.

- Klemm, K.W. 1993. Antibiotic bead chains. **Clin Orthop Relat Res.** 295:63-76.
- Jinks, D.C., R. Guthrie and E.W. Naylor. 1985. Simplified procedure for producing *Bacillus subtilis* spores for the Guthrie phenylketonuria and other microbiological screening tests. **J Clin Microbiol.** 21: 826-829.
- Jiranek, W.A., Hanssen, A.D., Greenwald, A.S. 2006. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. **J Bone Joint Surg Am.** 88:2487-2500.
- Lynch, S.R., J.D. Puglisi. 2001. Structural origins of aminoglycoside specificity for prokaryotic ribosomes. **J Mol Biol.** 306:1037-58.
- Mader, J., T. Calhoun and J. Cobos. 1997. In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. **Antimicrob Antimicrob Chemother** 41:415-418.
- McEvoy, G.K., E.K. Snow and J. Miller. 2009. AHFS Drug information 2009. the American Society of Health-System Pharmacists, **Inc.Bestheda.**
- McKellar, S.H., B.D. Allred, J.D. Marks, C.G. Cowley, D.C. Classen, S.C. Gardner and J.W. Long. 1999. Treatment of infected left ventricular assist device using antibiotic-impregnated beads. **Ann Thorac Surg.** 67:554-555.
- McLaughlin, J.E. and D.S. Reeves. 1971. Clinical and laboratory evidence for inactivation of gentamicin by carbenicillin. **Lancet.** 1: 261-4.
- Mitscher, L.A. 2002. Antibiotics and antimicrobial agents. In Williams, D.A and T.L. Lemke eds. **Foyes principles of medicinal chemistry.** Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- Nelson, C.L., F.M. Griffin, B.H. Harrison, R.E. Cooper. 1992. In vitro elution characteristics of commercially and noncommercially prepared antibiotic PMMA beads. **Clin Orthop Relat Res.** 284:303-9.
- Neut, D., H. Belt, I. Stokroos, J.R. Horn, H.C. Mei, H.J. Busscher. 2001. Biomaterial associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. **J Antimicrob Chemother.** 47:885-891.
- Nicholas, RA, H. Hamilton and M.S. Cohen. 1995. **β -lactam Antibiotics. In: Munson PL, ed. Principles of Pharmacology, Basis Concepts & Clinical Applications.** Chapman & Hall, New York.
- Orsini, J.A., Y. Elce and B. Kraus. 2004. Management of severely infected wounds in the equine patient. **Clinical techniques in equine practice.** 3: 225-236.
- Petri, W.A. Jr. n.d. Antimicrobial agents (continued), penicillins, cephalosporins, and other β -lactam antibiotics. *In* Hardman, J.G., J.E. Limbird, A.G. Gilman, eds. **Goodman & Gilman The pharmacological basis of therapeutics.** 10th ed. McGraw-Hill, New York.
- Phillips, H., D.M. Boothe, F. Shofer, J.S. Davidson and R.A. Bennett. 2007. In vitro elution studies of amikacin and cefazolin from polymethylmethacrylate. **Vet Surg.** 36:272-278.
- Plaster of Paris. 1980. **Industrial chemicals handbook.** edited by Small Business Publications (India). Board of Consultants and Engineers, Delhi.
- Quintiliani, R, M. French and C.H. Nightingale. 1982. First and second generation cephalosporins. **Med Clin North Amer** 66: 183-97.
- Rushton, N. 1997. Antibiotics. **Eur J Surg Suppl.** 578:27-30.

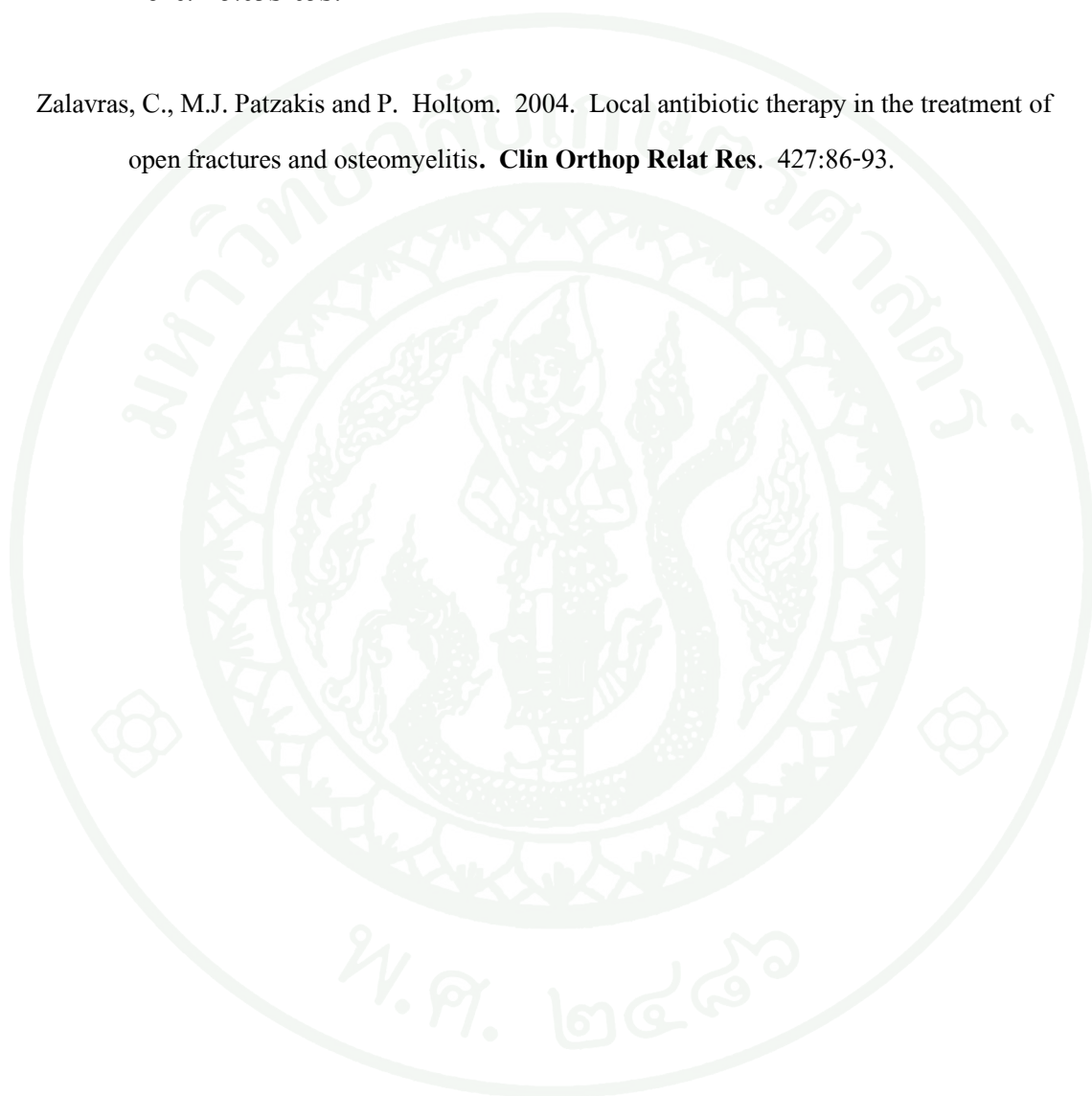
- Thomas, G. 2000. **Medicinal Chemistry**. John Wiley & Sons, Chuchester.
- Sanicola, S.M. and S.F. Albert. 2005. The *in vitro* elution characteristics of vancomycin and tobramycin from calcium sulfate beads. **Jfoot & ankle Surgery**. 44:121-124.
- Santschi, E.M. and L. McGarvey. 2003. In vitro elution of gentamicin from plaster of Paris beads. **Vet Surg**. 32:128-133.
- Sasaki, T., Y. Ishibashi, H. Katano, A. Nagumo and S. Toh. 2005. In vitro elution of vancomycin from calcium phosphate cement. **J Arthro**. 20:1055-1059.
- Seeley, S.K., J.V. Seeley, P. Telehowski, S. Martin, M. Tavakoli, and S.L. Colton. 2003. Volume and surface area study of tobramycin-polymethylmethacrylate beads. **Clin Orthop Relat Res**. 420:298-303.
- Souza, M.J., C.F. Bittencourt and S. Filho. 2004. Performance characteristics of bioassay UV-spectrophotometry and high performance liquid chromatographic determination of gatifloxacin in tablets. **Int J Pharm**. 271:287-291.
- Stengel, D., K. Bauwens, J. Sehouli, A. Ekkernkamp, F. Porzsolt. 2001. Systematic review and meta-analysis of antibiotic therapy for bone and joint infections. **Lancet Infect Dis**. 1: 175-88.
- Strocchi, R., G. Orsini, G. Iezzi, A. Scarano, C. Rubini, G. Pecora and A. Piattelli. 2002. Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits. **J Oral Implantol**. 28:273-278.
- Stone, P.A., P.A. Armstrong, D.F. Bandyk, R.S. Brumberg, S.K. Flaherty, M.R. Back, B.L. Johnson and M.L. Shames. 2006. Use of antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads for the treatment of extracavitary prosthetic vascular graft infections. **J Vasc Surg**. 44:757-761.

- Turner, T.M., R.M. Urban, S. Gitelis, W.O. Haggard and K. Richelsoph. 2003. Resorption evaluation of a large bolus of calcium sulfate in a canine medullary defect. **Orthopedics**. 26(Suppl): s577-s579.
- Ueng, S.W.-N., L.-J.Yuan, N. Lee, S.-S.Lin, S.-J.Liu, E.-C.Chan, and J.-H. Weng. 2002. In vivo study of hot compressing molded 50:50 poly (DL-lactide-co-glucolide) antibiotic beads in rabbits. **J Orthop Res**. 20:654-661.
- Udomkusonsri, P., S. Kaewmokul, S. Arthitvong, S. Tuek-um and N. Kusucharit. 2008. The efficacy of calcium sulfate as a Cefazolin-loaded Materials Compares with Polymethylmethacrylate Beads: an *in vitro* study. **The 15th Congress of the Federation of Asian Veterinary Associations FAVA-OIE Joint Symposium on Emerging Diseases**. 397-398.
- Udomkusonsri, P., S. Kaewmokul, S. Arthitvong and N. Phaochoosak. 2012. Elution Profiles of Cefazolin from PMMA and Calcium Sulfate Beads Prepared from Commercial Cefazolin Formulations. **J. Vet. Med. Sci**. 74(3):301-305.
- Wahlig, H., E. Dingeldein, R. Bergmann, and K. Reuss. 1979. The release of gentamicin from polymethylmethacrylate bead an experimental and pharmacokinetic study. **J. Bone. Joint. Surg. Br**. 60:270-275.
- Walterspiel, J.N., S. Feldman, R. Van and W.R. Ravis . 1991. Comparative inactivation of isepamicin, amikacin, and gentamicin by nine beta-lactams and two beta-lactamase inhibitors, cilastatin and heparin. **Antimicrob Agents Chemother**. 35: 1875-8.
- Wang, G., S.-J.Liu, S.W.-N.Ueng and E.-C.Chan. 2004. The release of cefazolin and gentamicin from biodegradable PLA/PGA beads. **Int J Pharm**. 273:203-212.
- Weiss, B.D., E.C. Weiss, W.O. Haggard, R.P. Evans, S.G. McLaren and M.S. Smeltzer. 2009. Optimized elution of daptomycin from polymethylmethacrylate beads. **Antimicrob Agents Chemother**. 53:264-6.

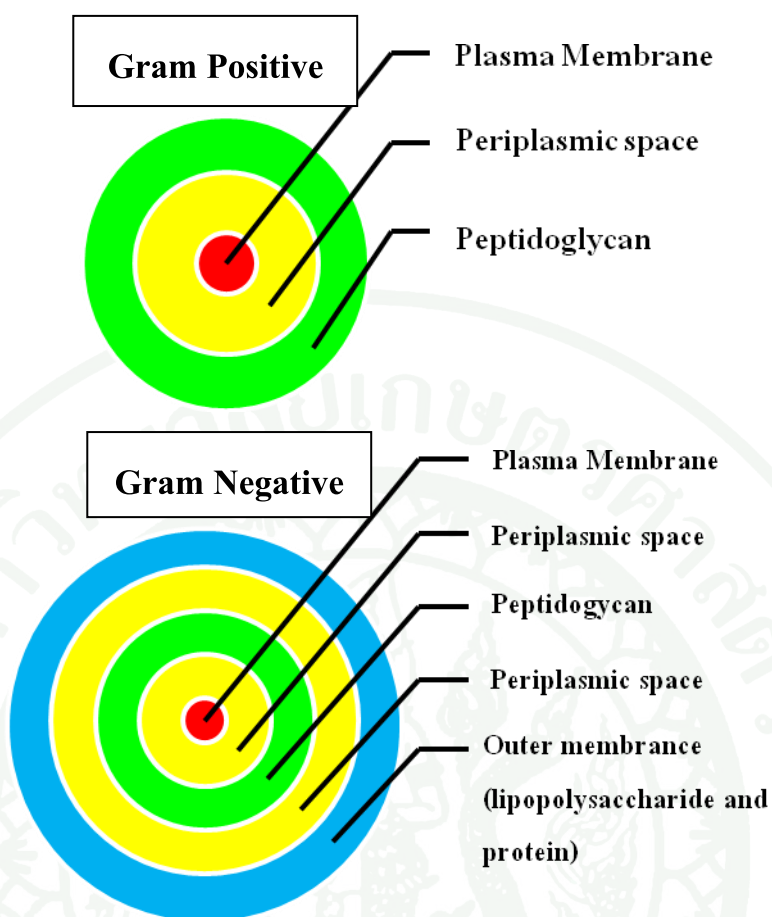
Wininger, D.A. and R.J. Fass. 1996. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. **Antimicrob Agents Chemother.** 40:2675-2679.

Zahraoui, C. and P. Sharrock. 1999. Influence of sterilization on injectable bone biomaterials. **Bone.** 25:63S-65S.

Zalavras, C., M.J. Patzakis and P. Holtom. 2004. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. **Clin Orthop Relat Res.** 427:86-93.







ภาพผนวกที่ 1 การเปรียบเทียบโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรียระหว่างแกรมบวก (Positive) และ แกรมลบ (Negative)



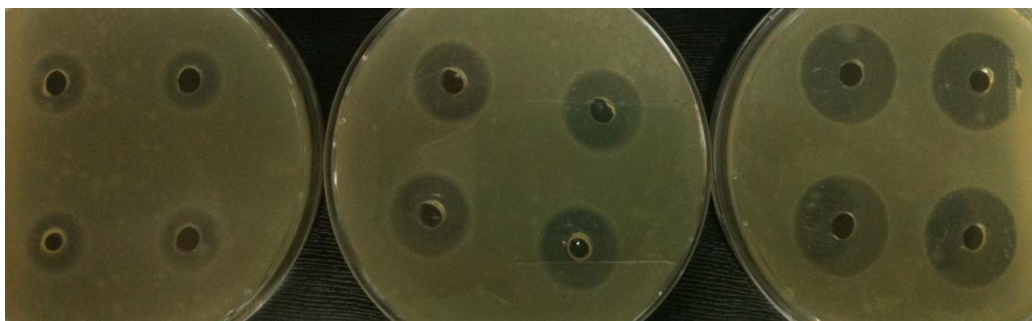
ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะของลูกปิดขยาปฎิชีวนะอยู่ในแบบหล่อเมื่อแห้ง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Negative control (no bacteria)											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	Positive control (no drug)											

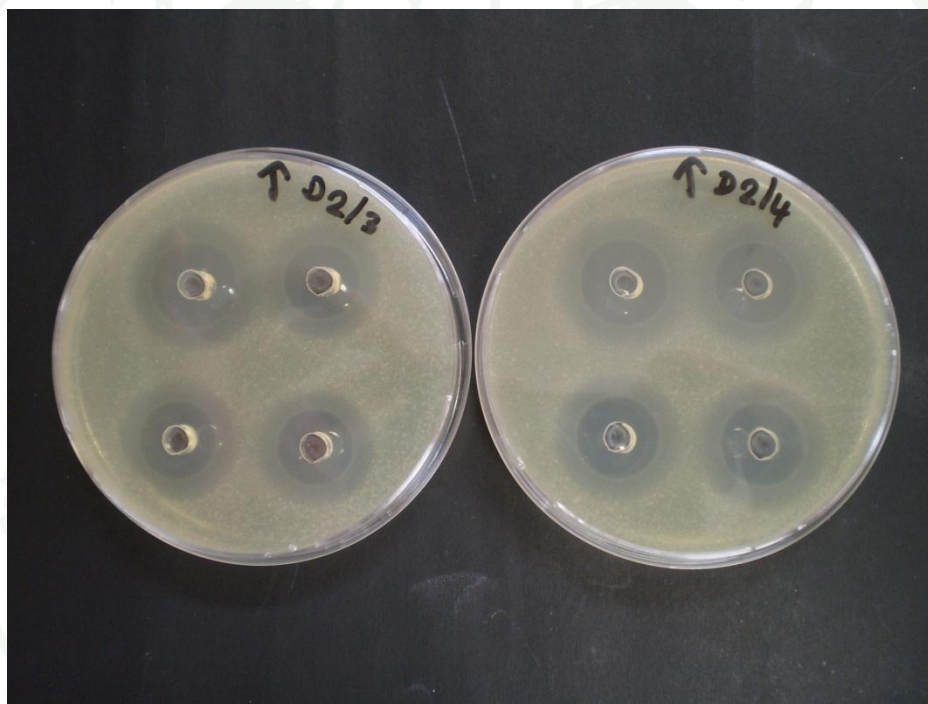
ภาพผนวกที่ 3 แบบจำลองการทดสอบ MIC ใน 96 well plate



ภาพผนวกที่ 4 การทดสอบ MIC ของยาเซฟฟาโซลิน (cefazolin) กับยาเซฟตาซิดิม (ceftazidime) ใน 96 well plate



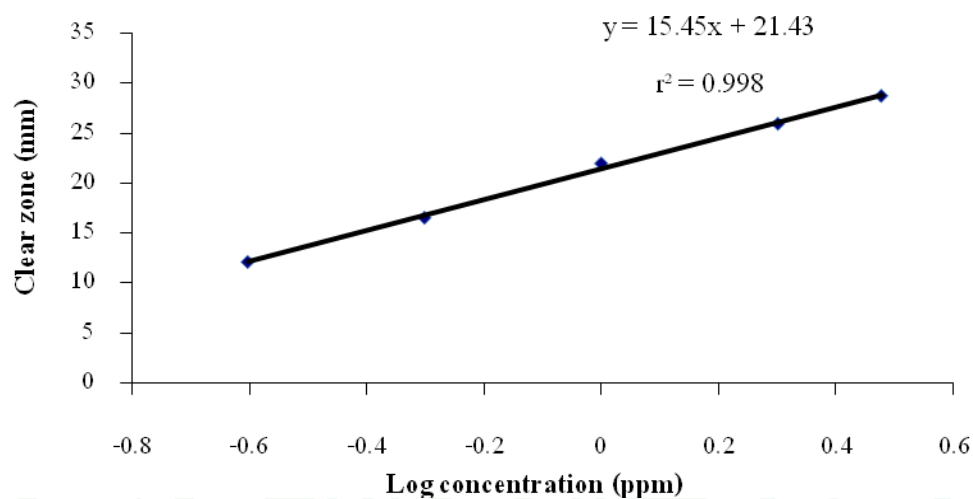
ภาพผนวกที่ 5 การเปรียบเทียบค่าเขตการยับยั้งการเจริญของเชื้อของลูกปิดยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่างกันจากถาดซ้ายมีความเข้มข้นน้อยสุดไปหาถาดขวามีความเข้มข้นมากที่สุด



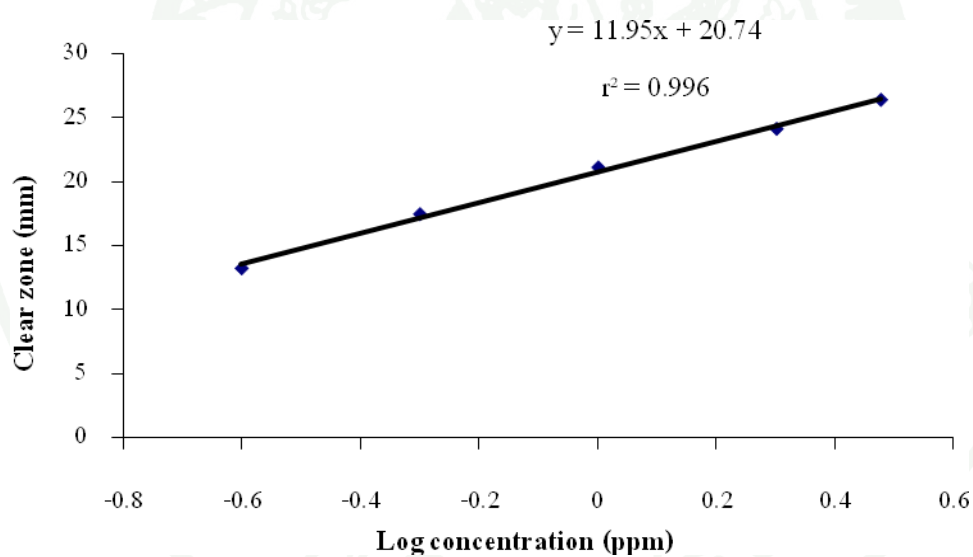
ภาพผนวกที่ 6 ผลการทดลองการปลดปล่อยยาเซฟฟาโซลินจากลูกปิดยาเซฟฟาโซลิน-แคลเซียมซัลเฟต

ตารางผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (Phosphate Buffer Saline)
(0.1 MPBS,pH 7.4)

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (Phosphate Buffer Saline) (0.1 M PBS, pH 7.4)			
สารละลายใช้เพื่อ	ชื่อสารเคมี	ใช้สารเคมี (กรัม)	ปริมาณน้ำ
A	0.2 M dibasic sodium phosphate (MW 177.99) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	17.799	เติมน้ำใส่ครบ 500 มิลลิลิตร
	0.2 M monobasic sodium phosphate (MW 119.98) (NaH_2PO_4)	11.998	เติมน้ำใส่ครบ 500 มิลลิลิตร
เตรียม 0.1 M PBS, pH 7.4 โดยนำสารละลาย A = 202.5 มิลลิลิตรและสารละลาย B = 47.5 มิลลิลิตรมารวมกันแล้วเติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร			

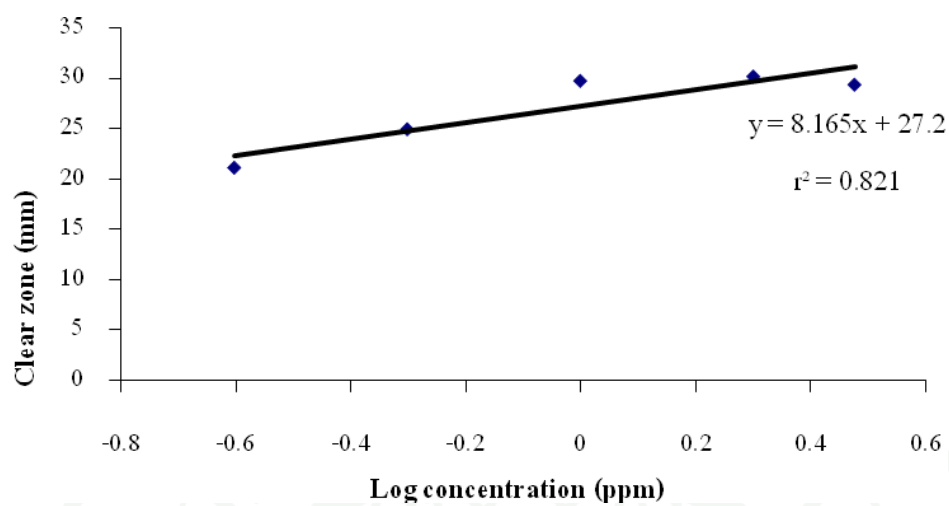


(ก) เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

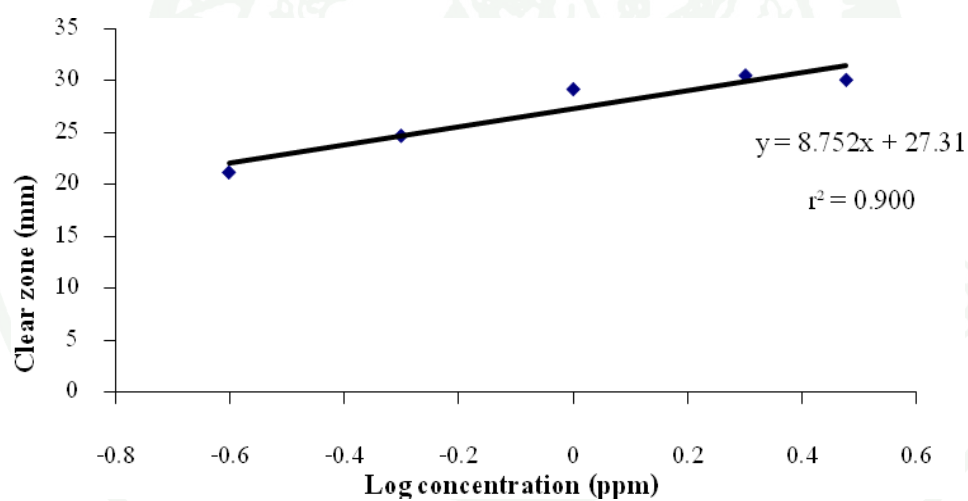


(ข) เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 7 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 1

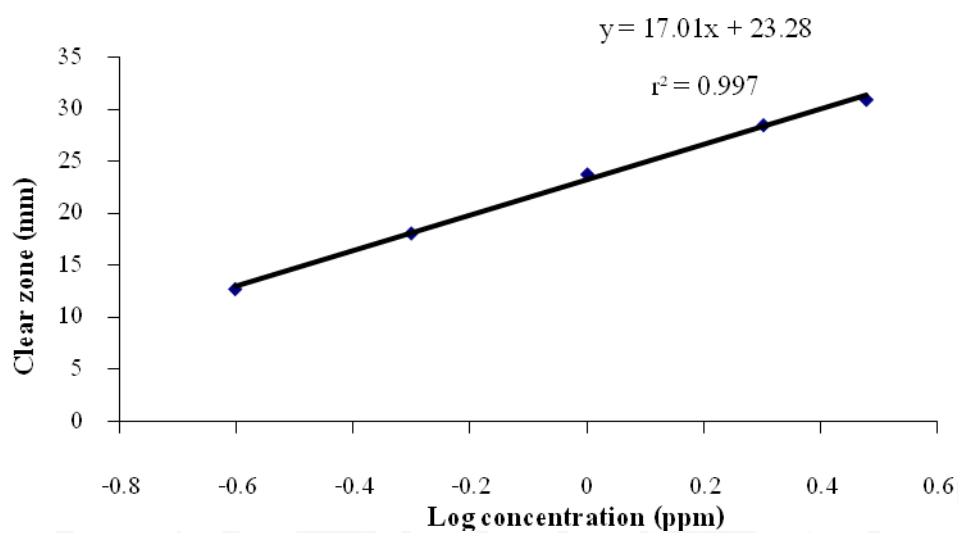


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

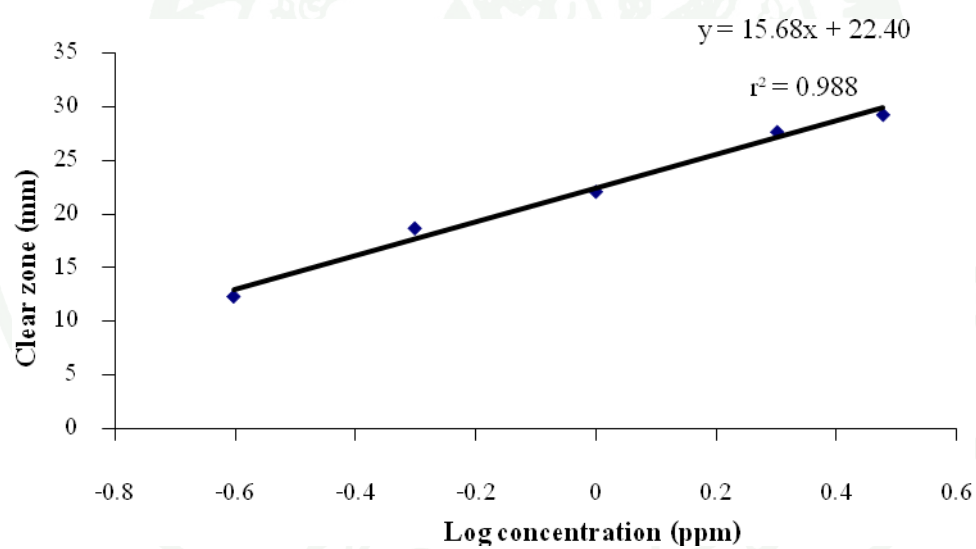


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 8 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 2

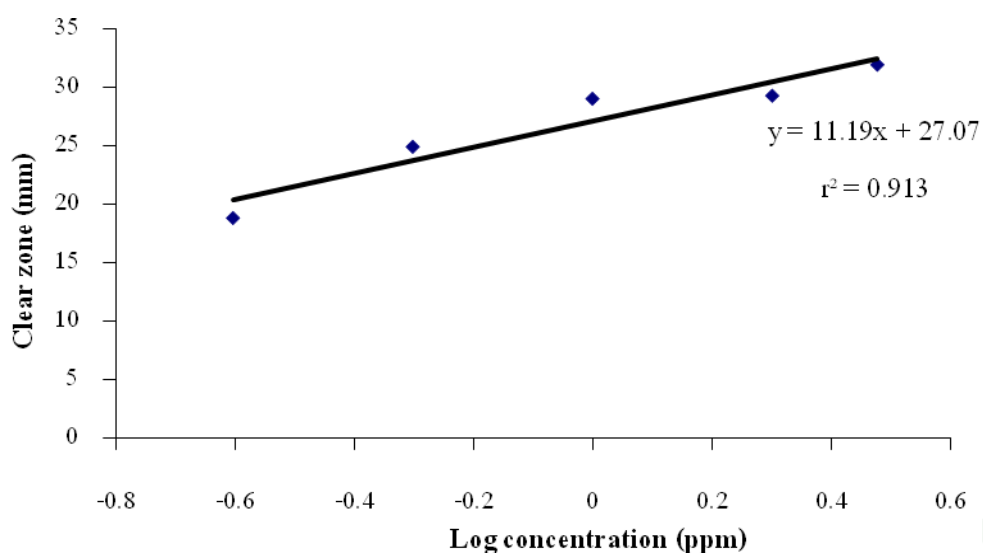


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

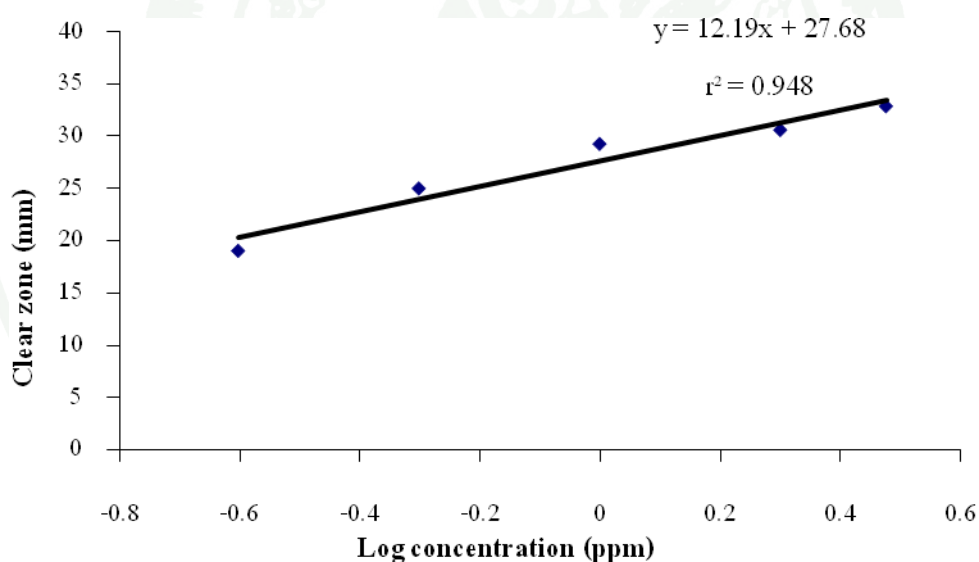


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 9 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 3

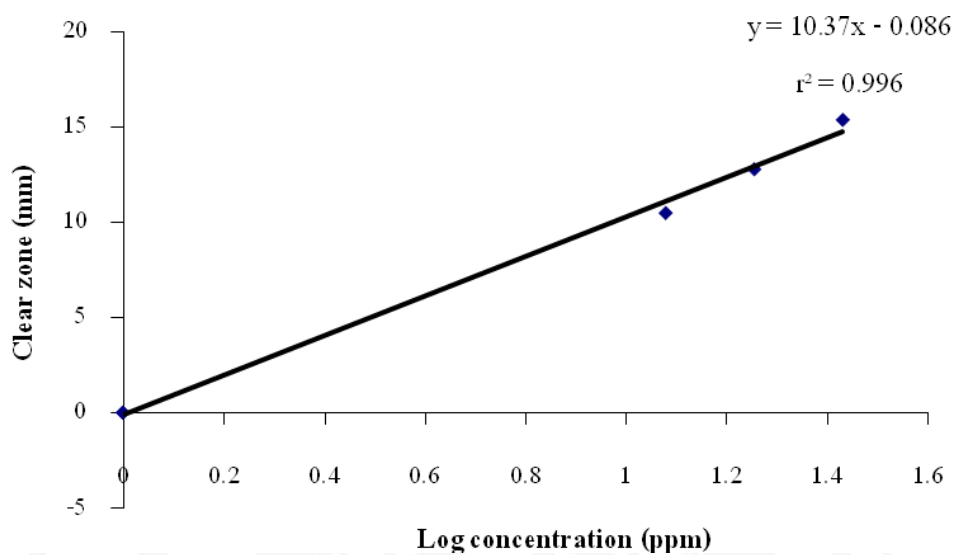


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

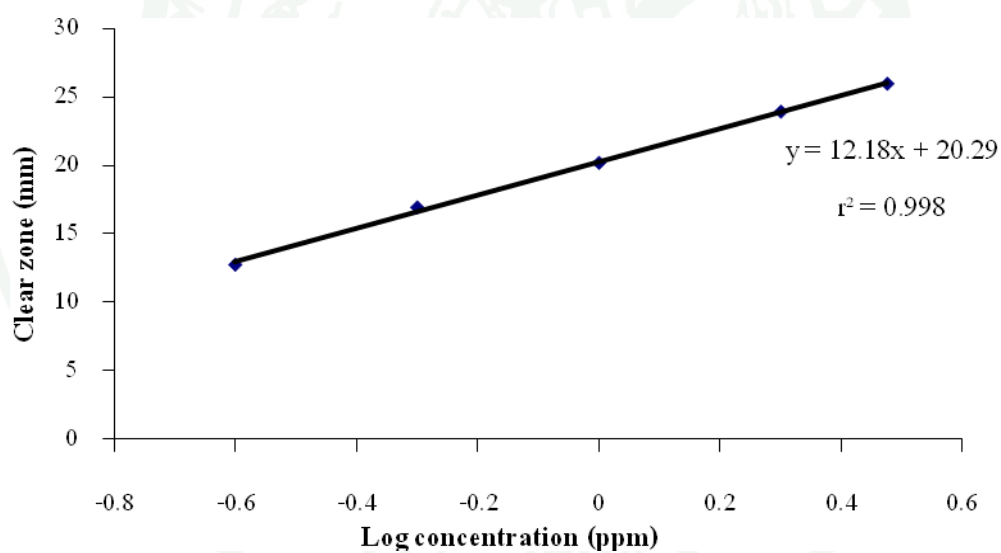


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 10 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 4

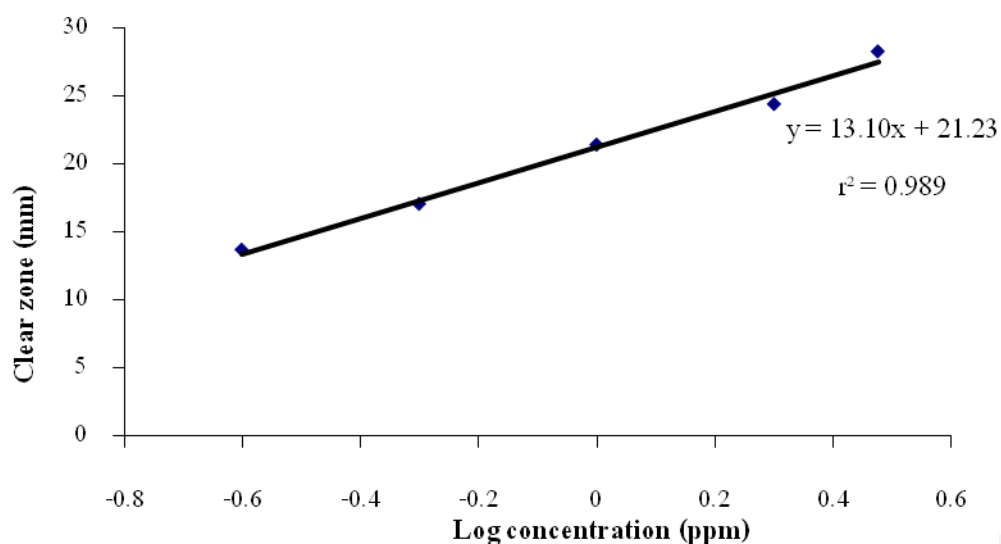


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

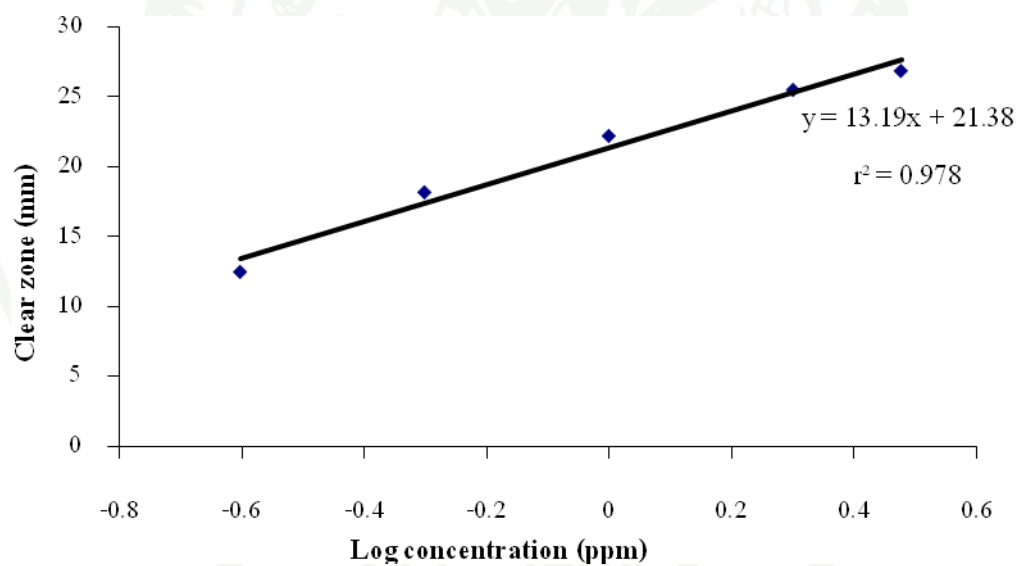


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 11 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 5

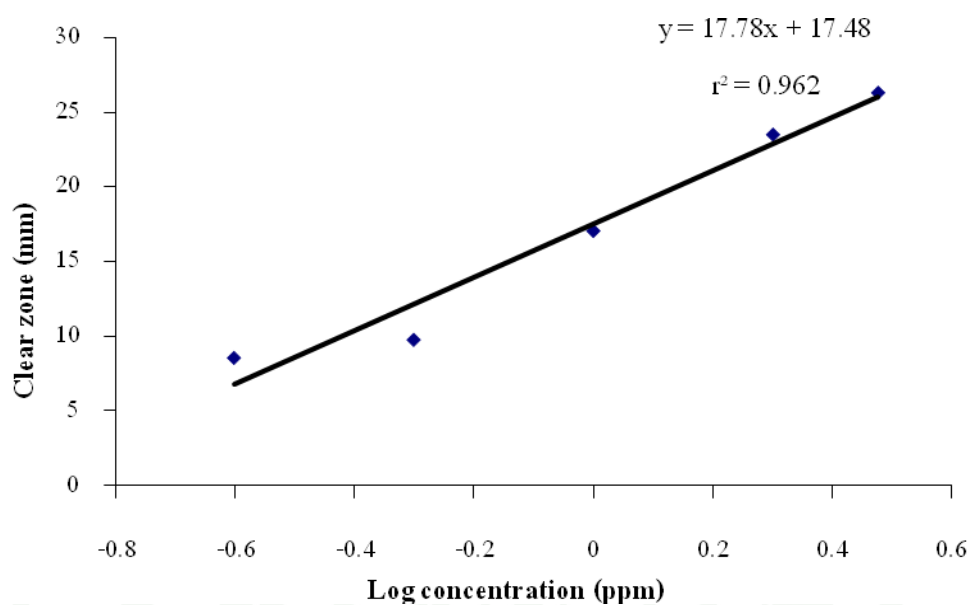


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

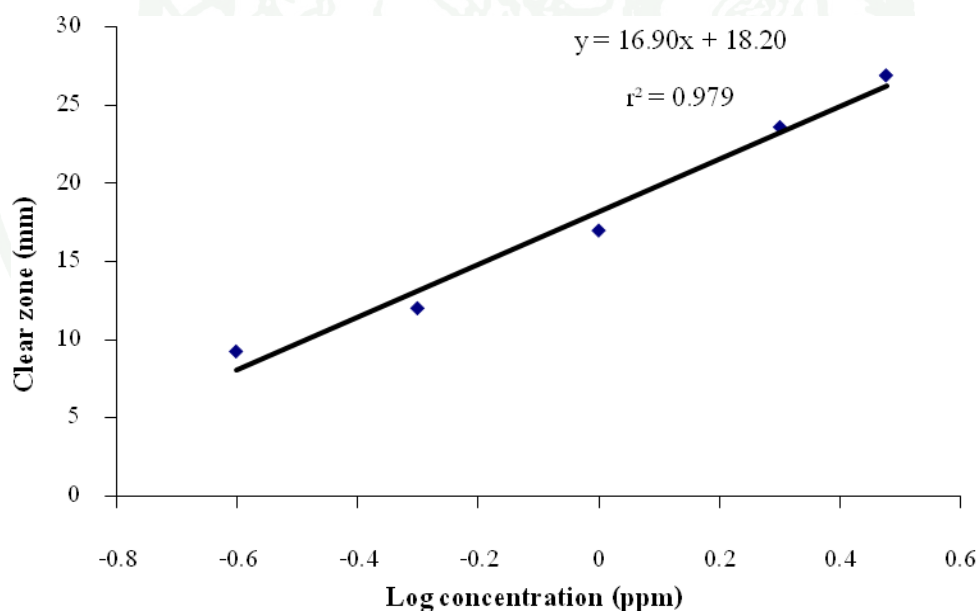


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 12 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 6

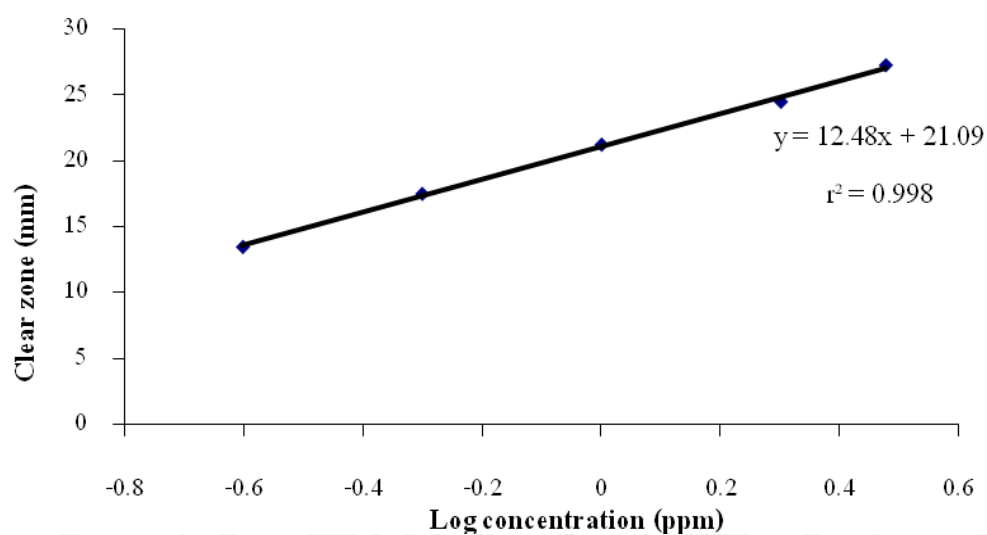


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

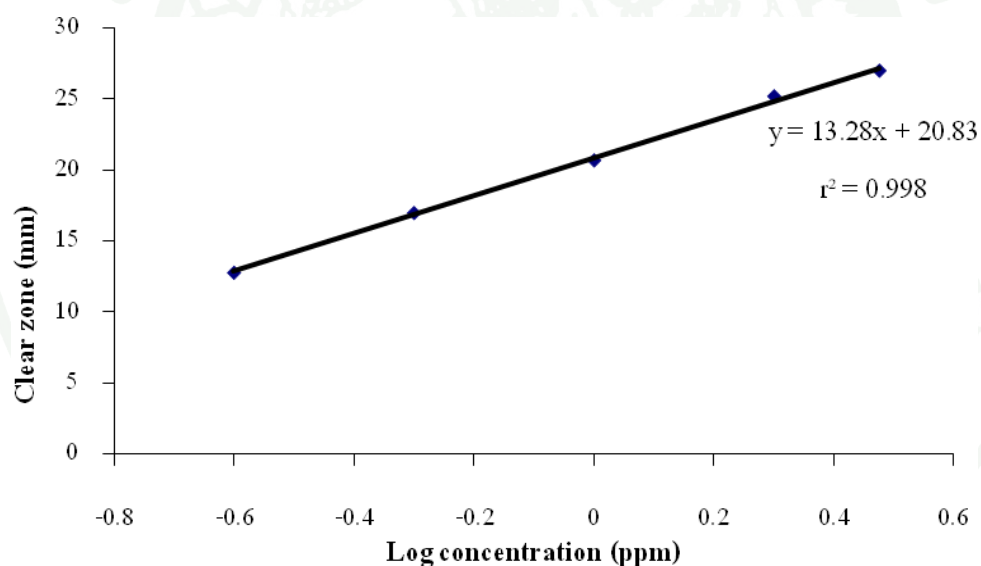


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 13 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 7

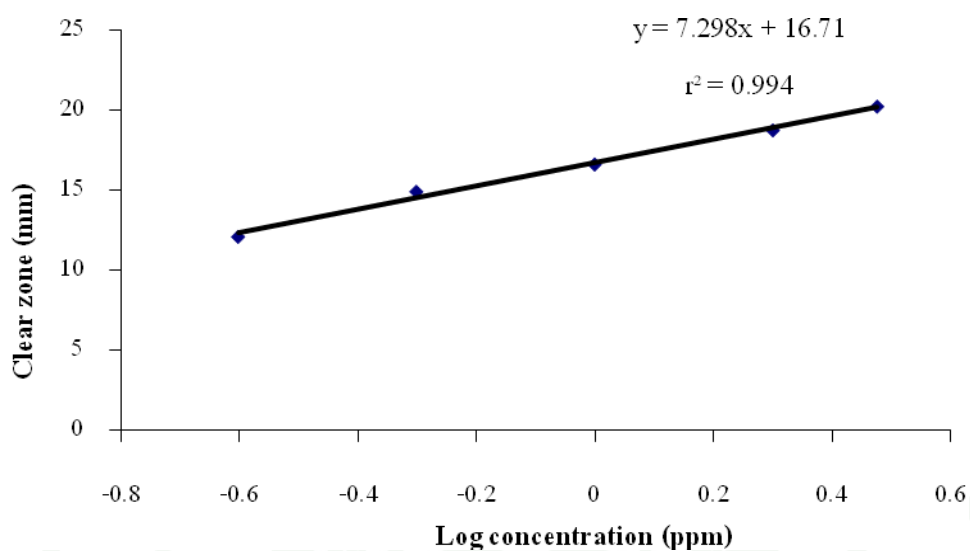


(ก) เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

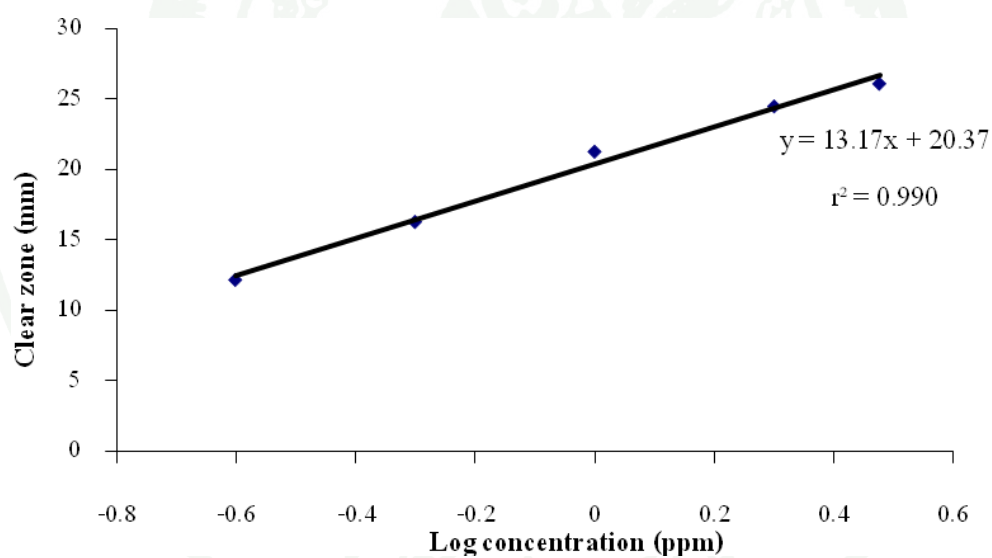


(ข) เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 14 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 8

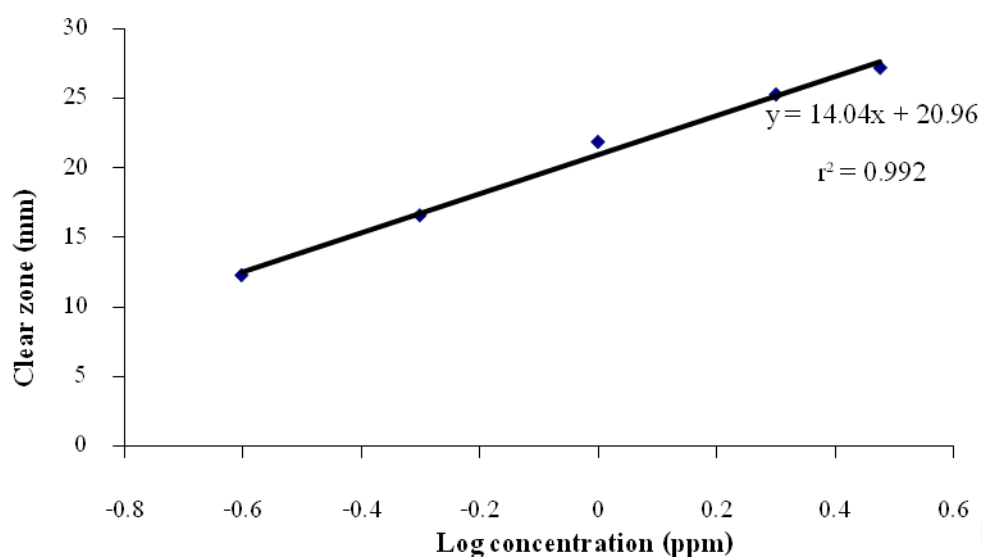


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

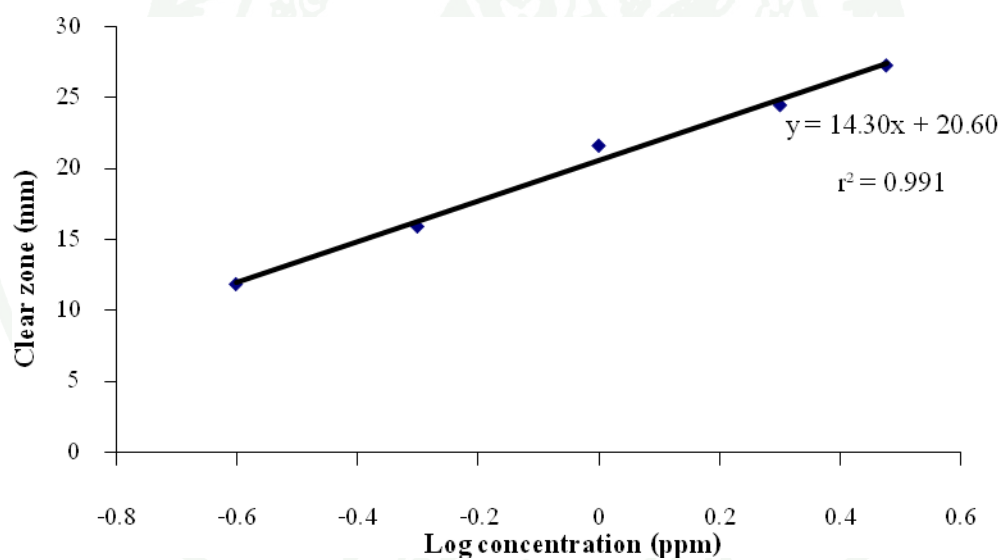


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 15 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 9

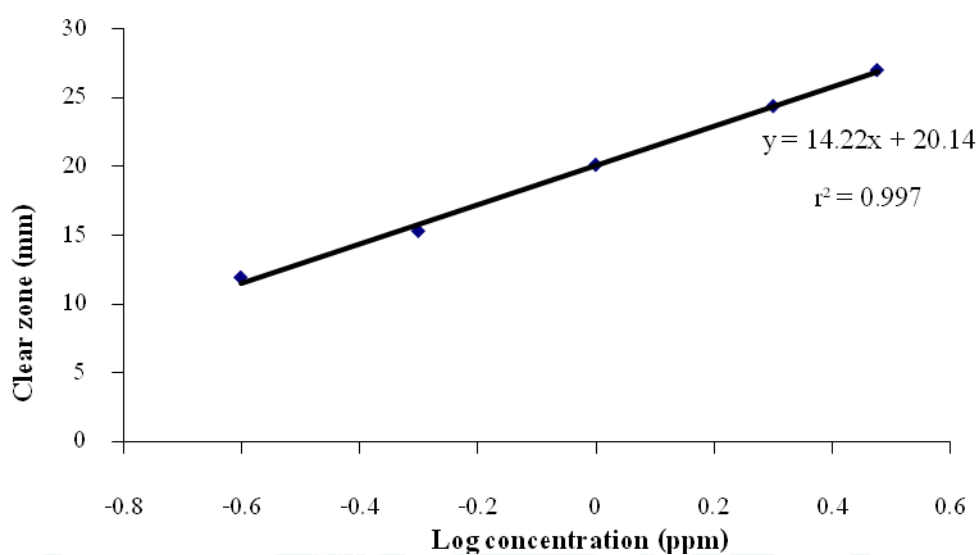


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

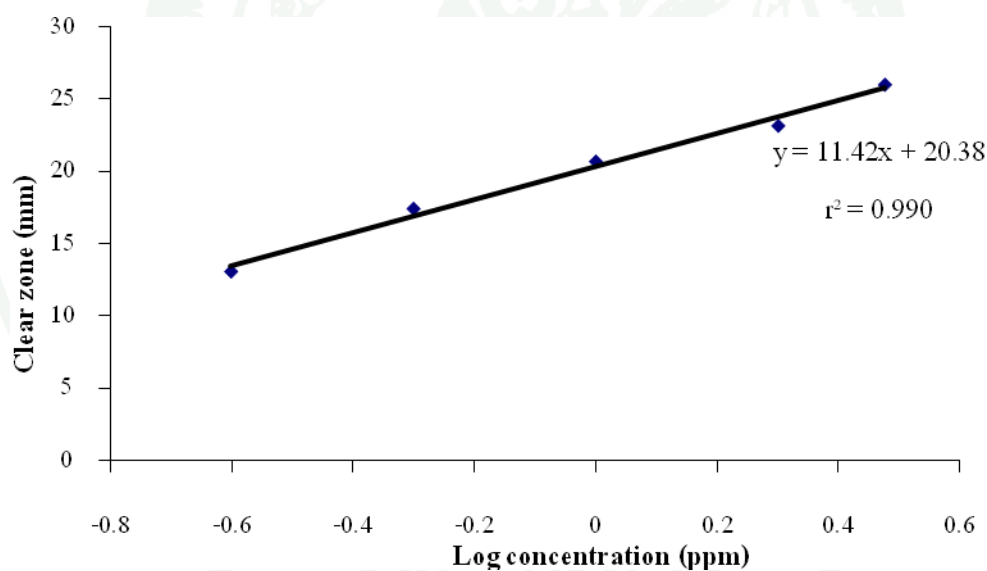


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 16 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 10

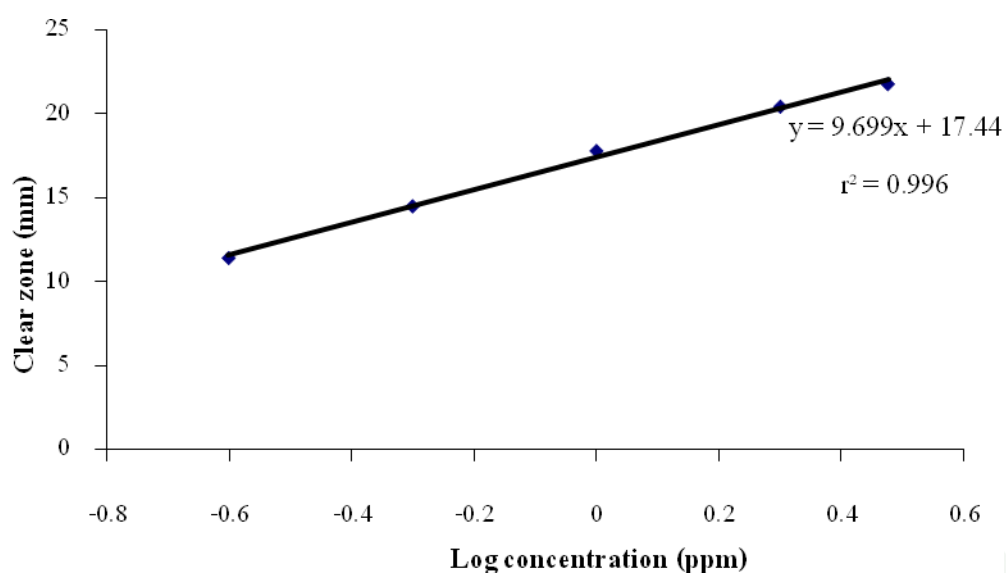


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

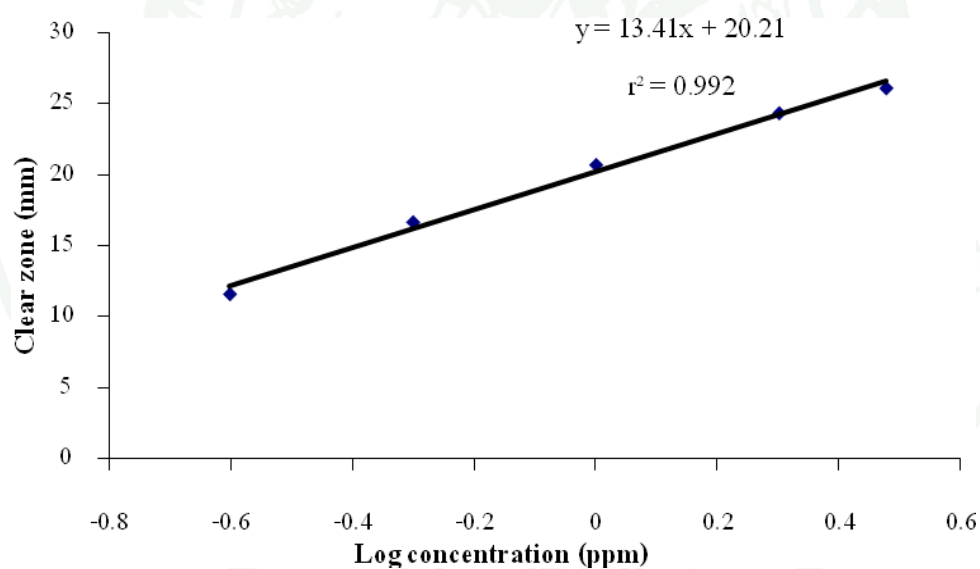


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 17 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 11

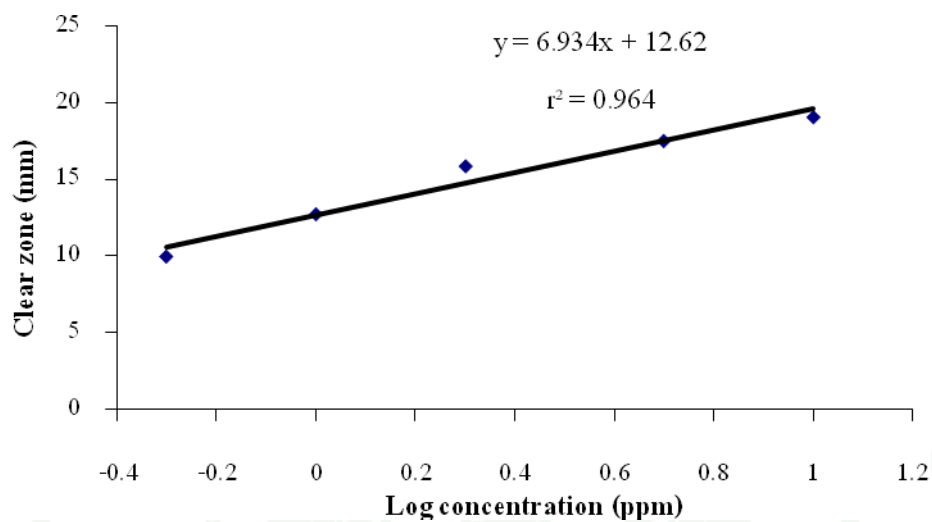


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

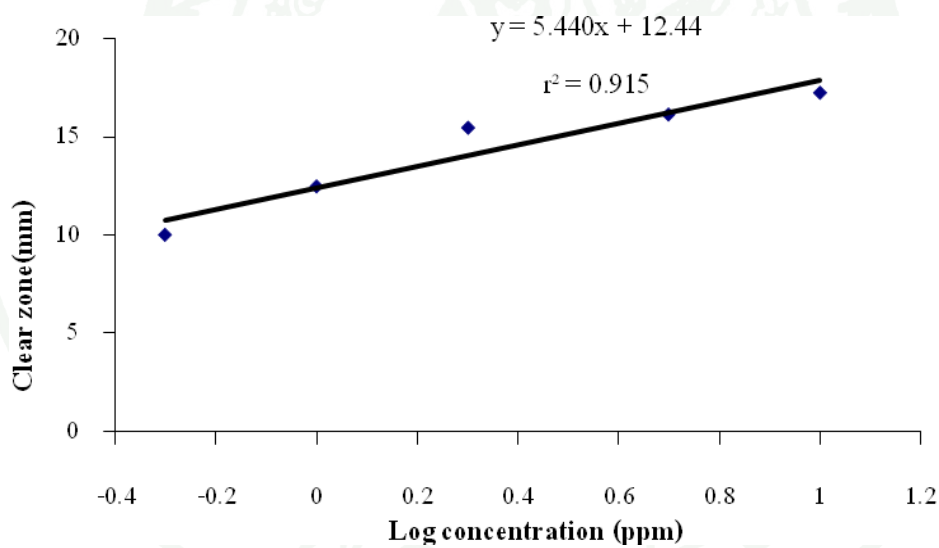


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 18 เส้นตรงมาตรฐานของยาเอนโรฟลอกซาซินเดือนที่ 12

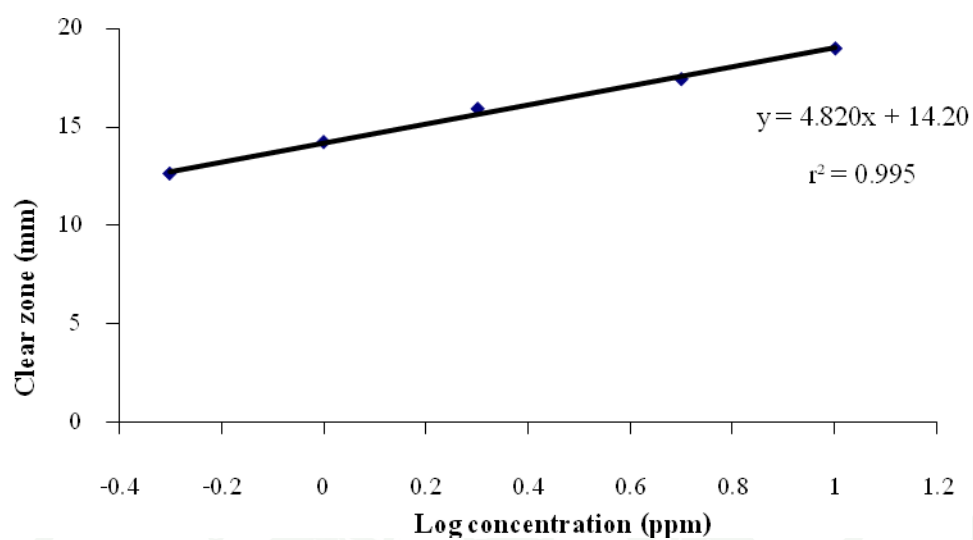


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

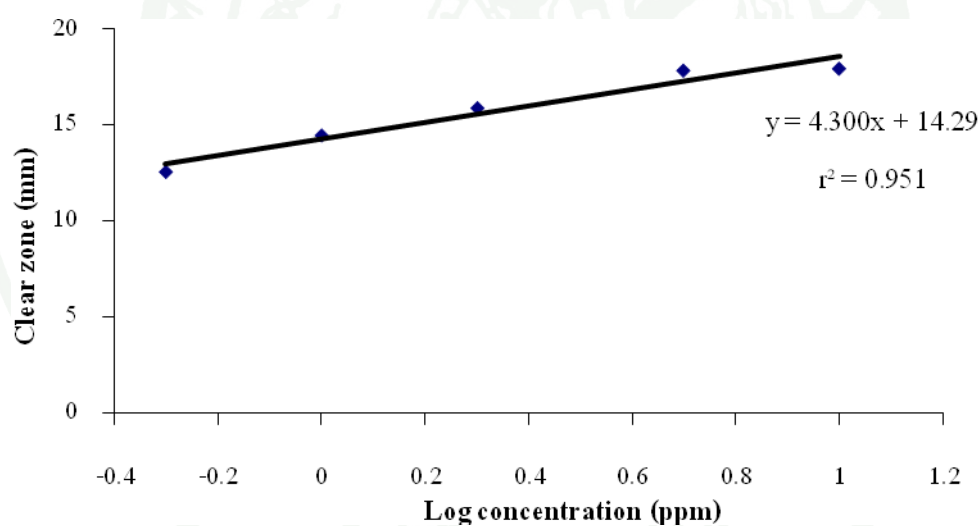


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 19 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 1

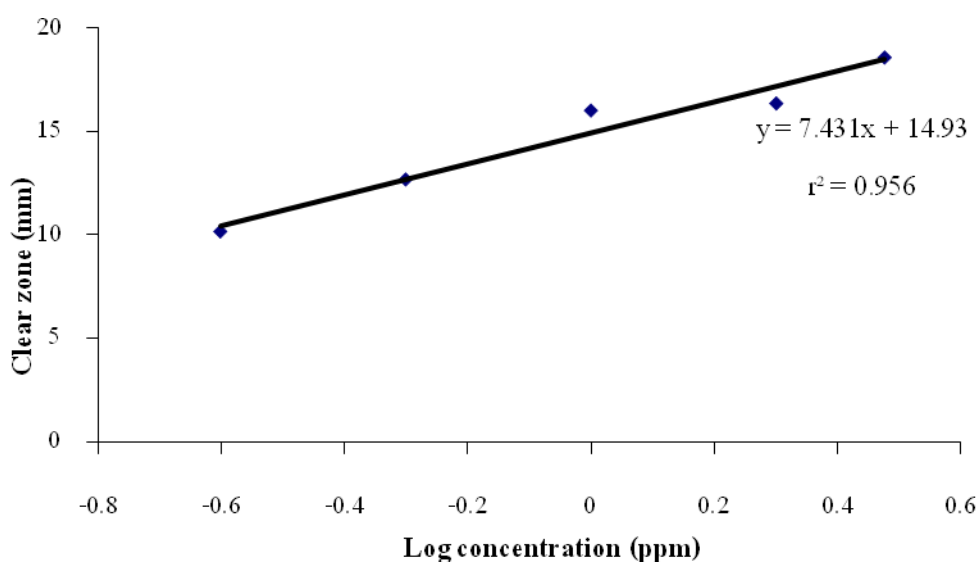


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

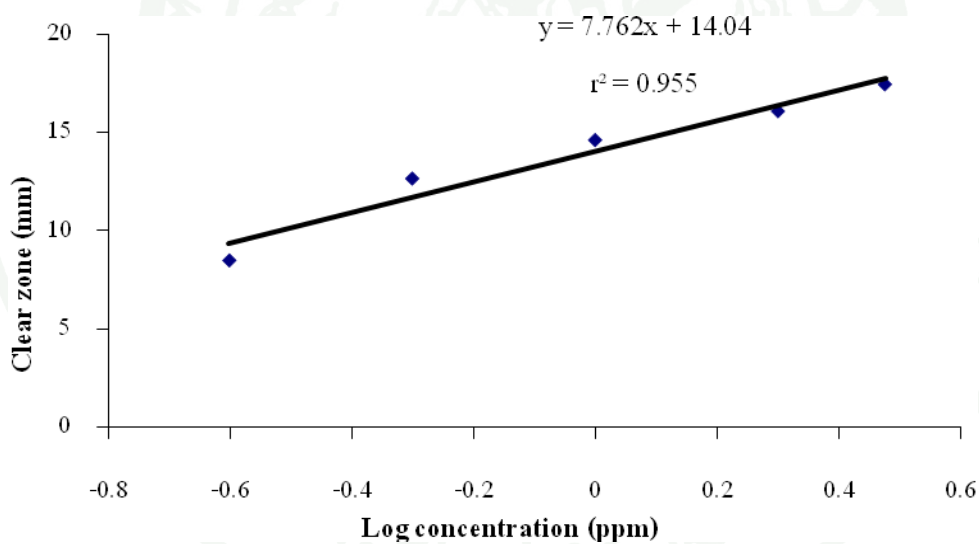


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 20 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 2

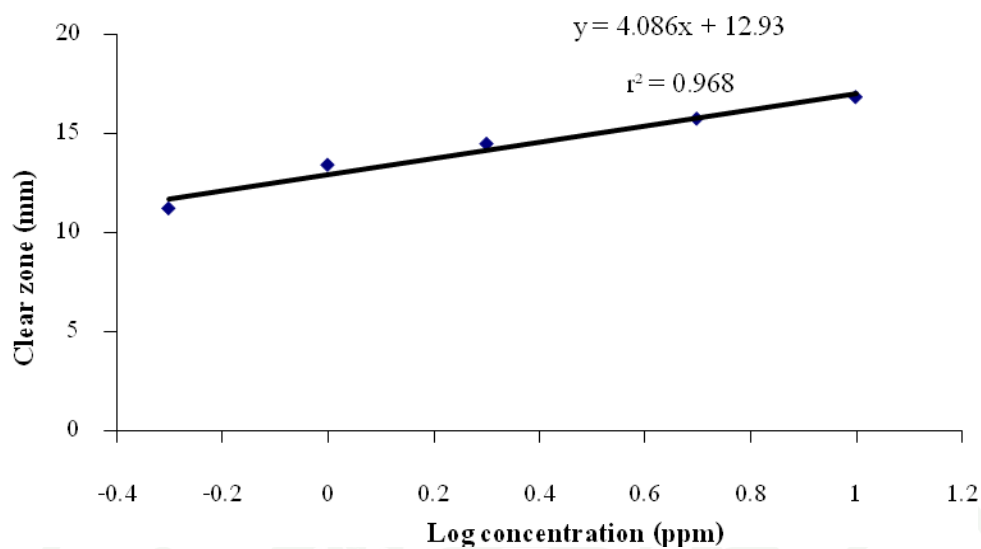


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

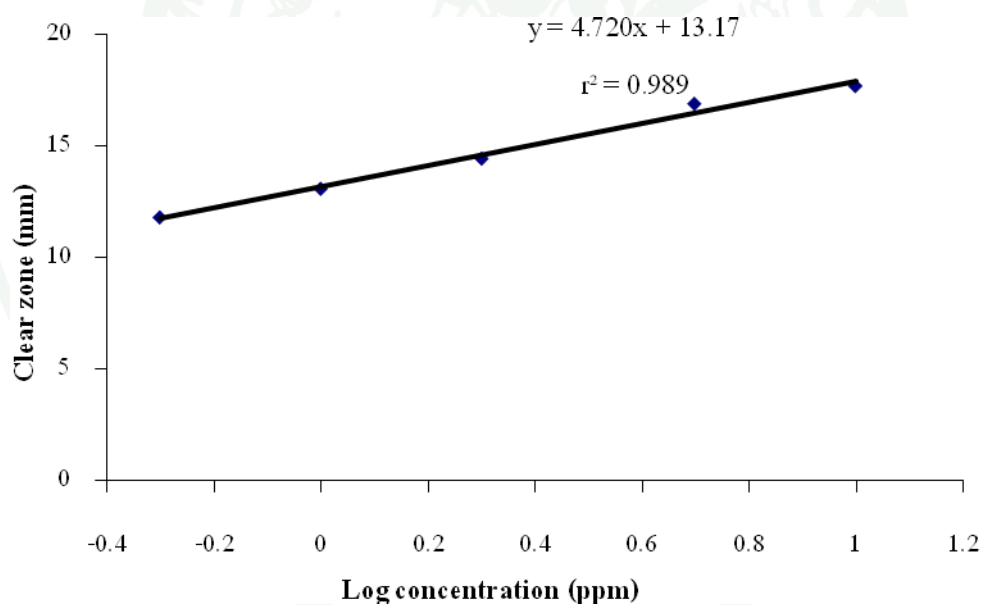


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 21 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 3

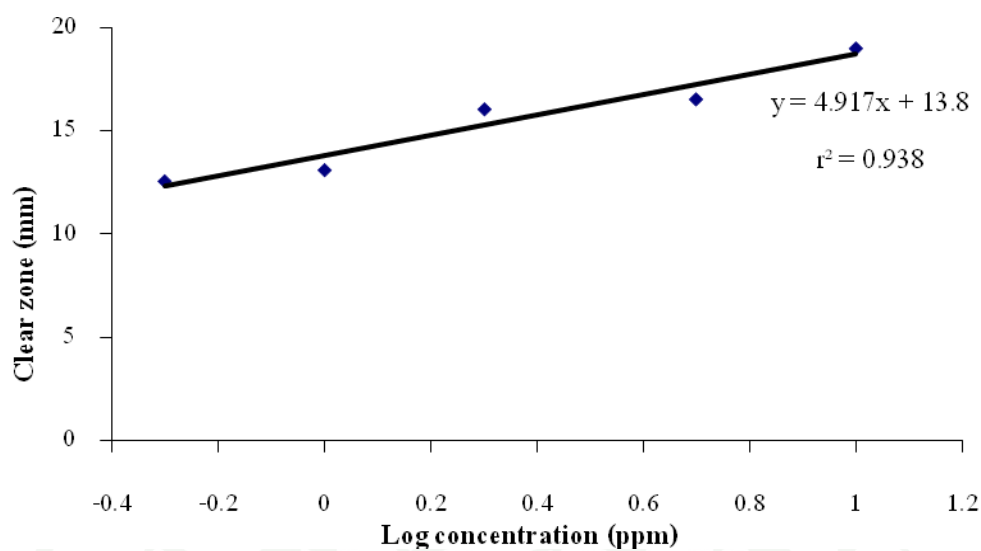


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

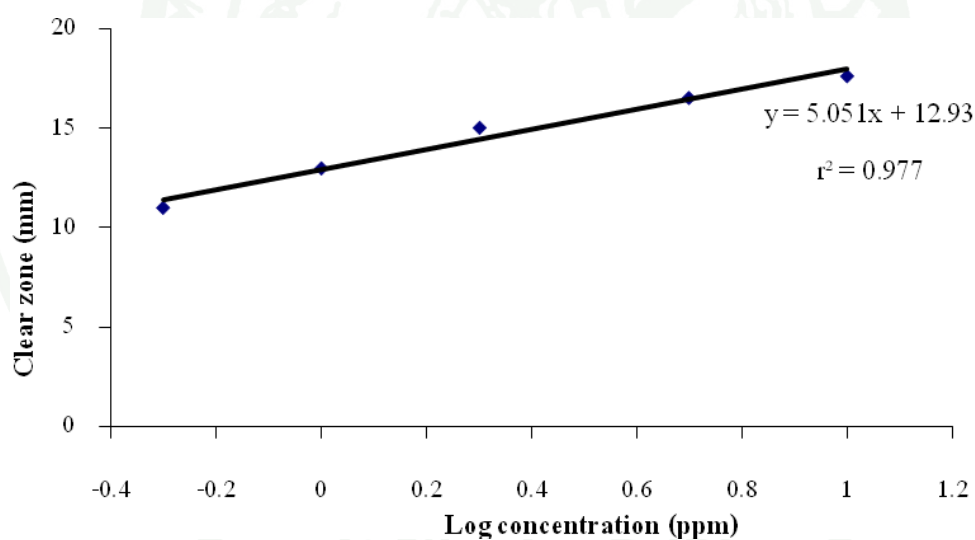


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 22 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 4

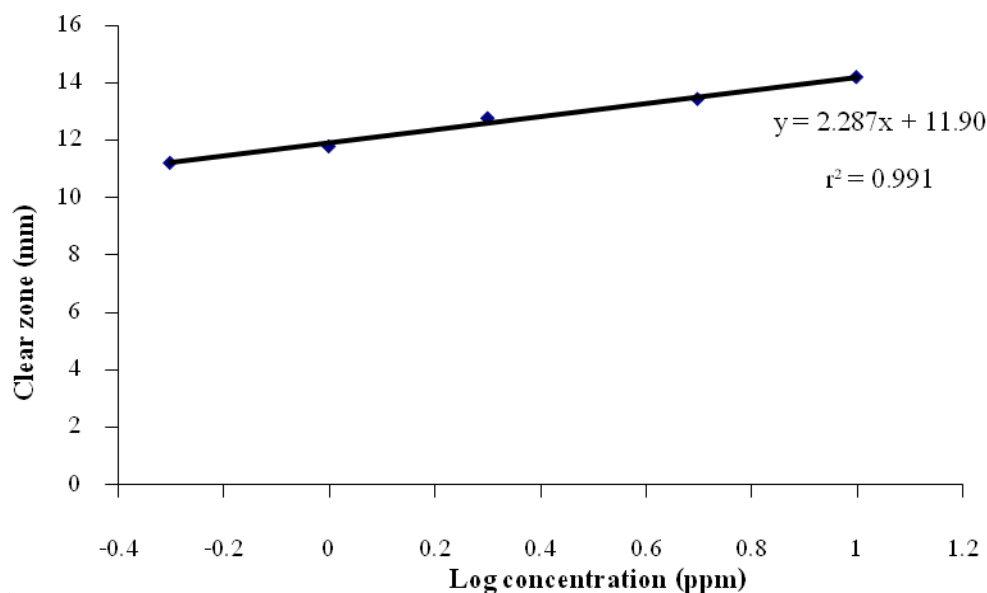


(ก) เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

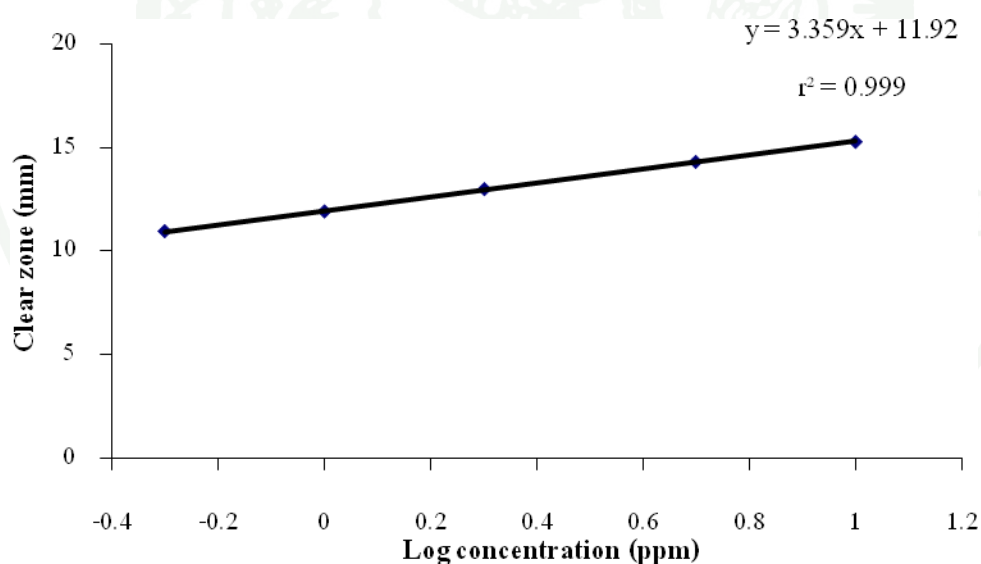


(ข) เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 23 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 5

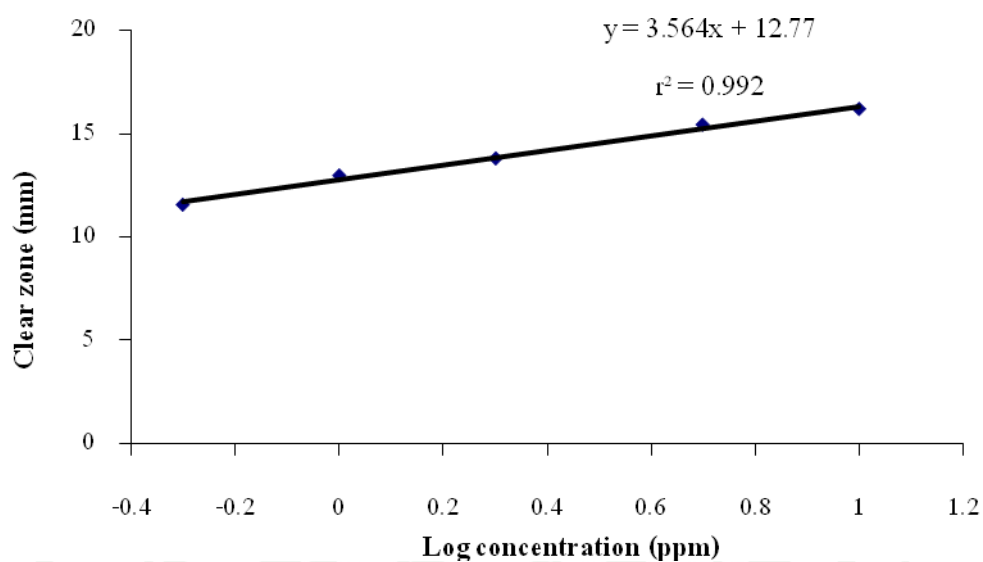


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามยัชนีที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

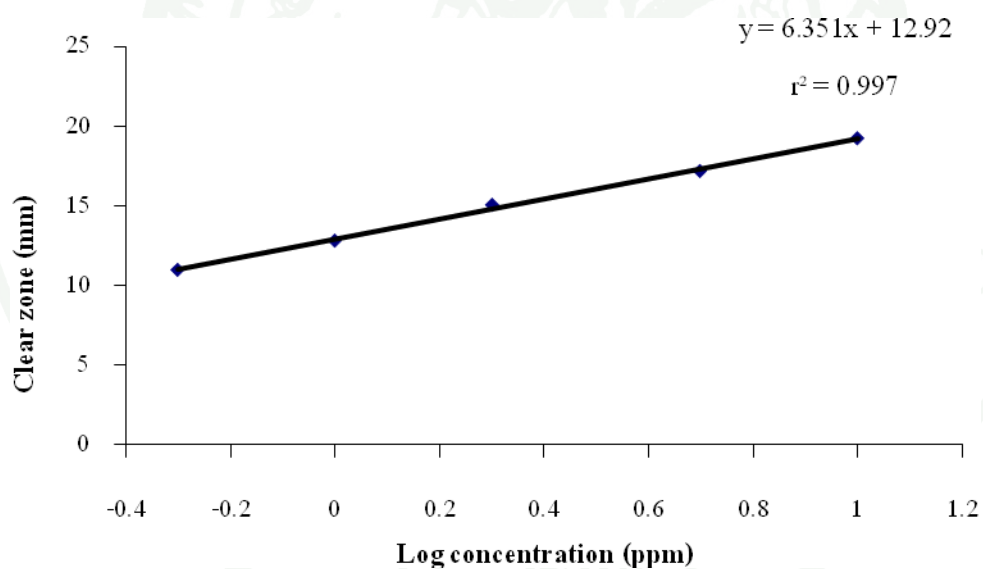


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามยัชนีที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 24 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามยัชนีเดือนที่ 6

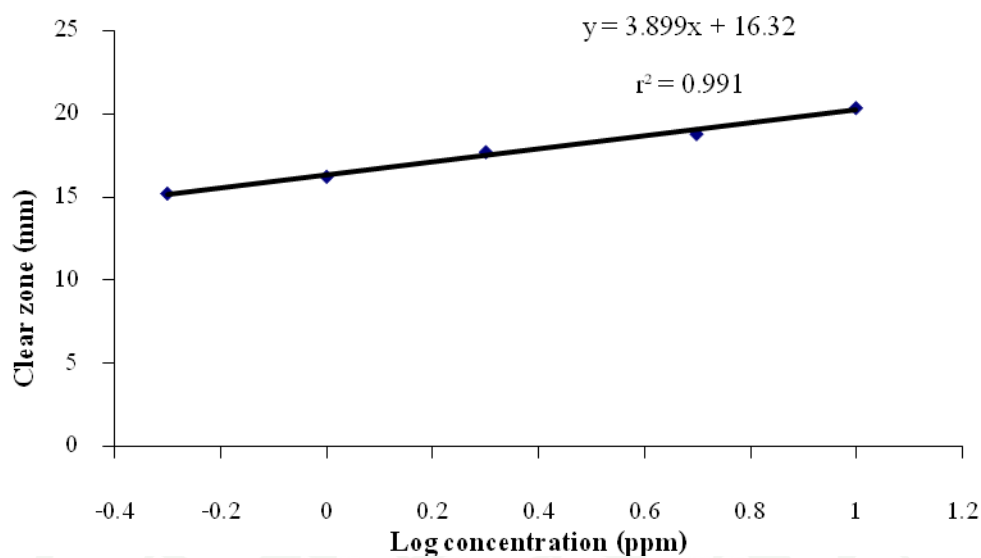


(ก) เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

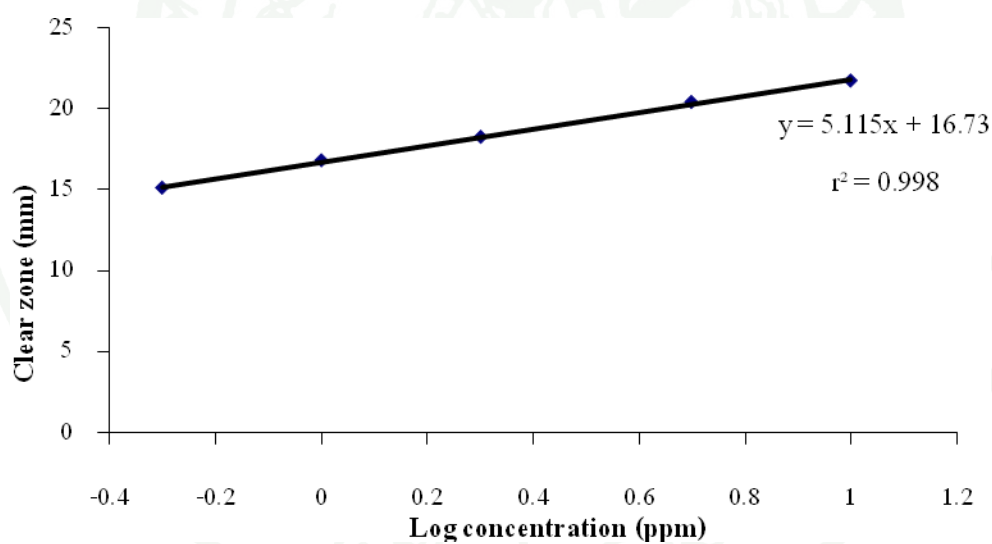


(ข) เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 25 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 7

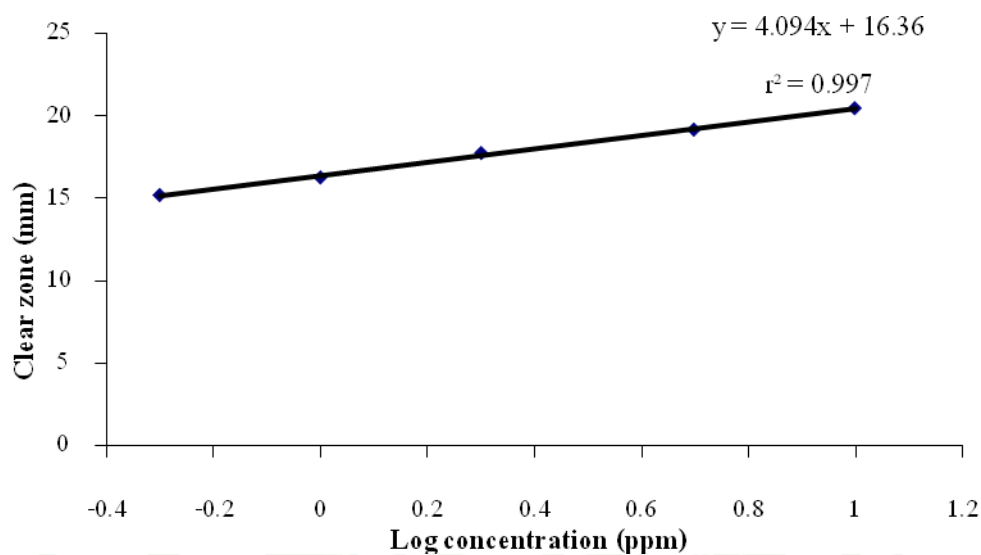


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

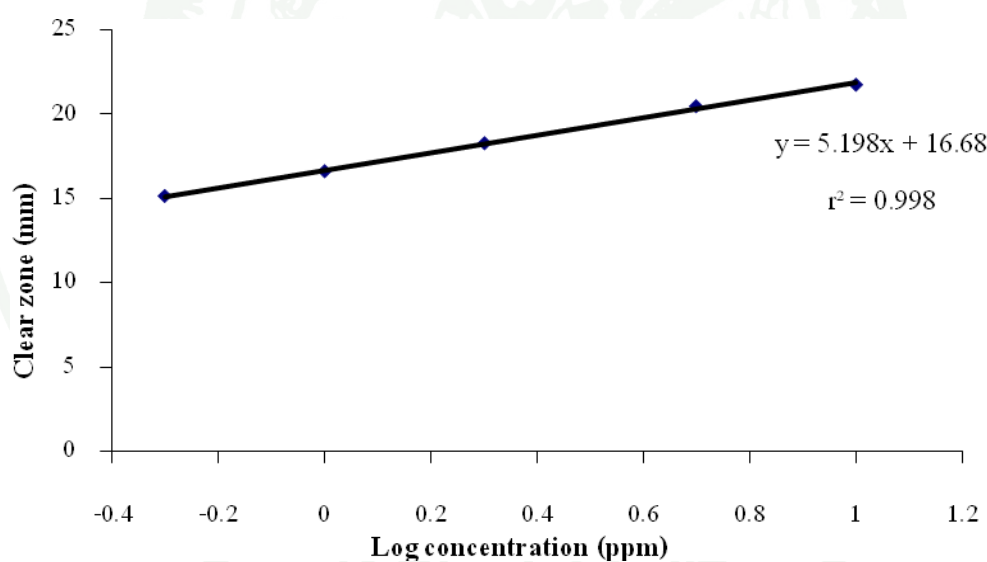


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 26 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 8

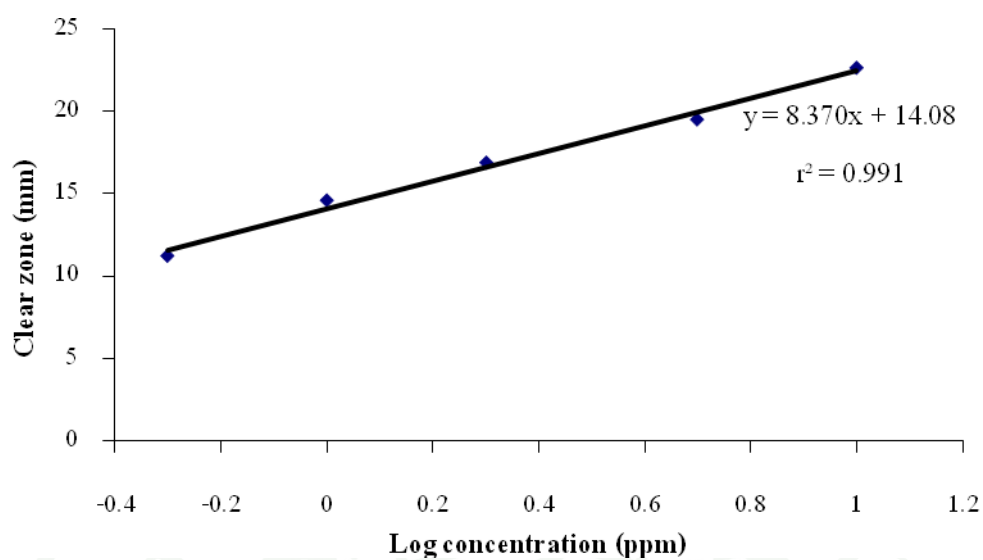


(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

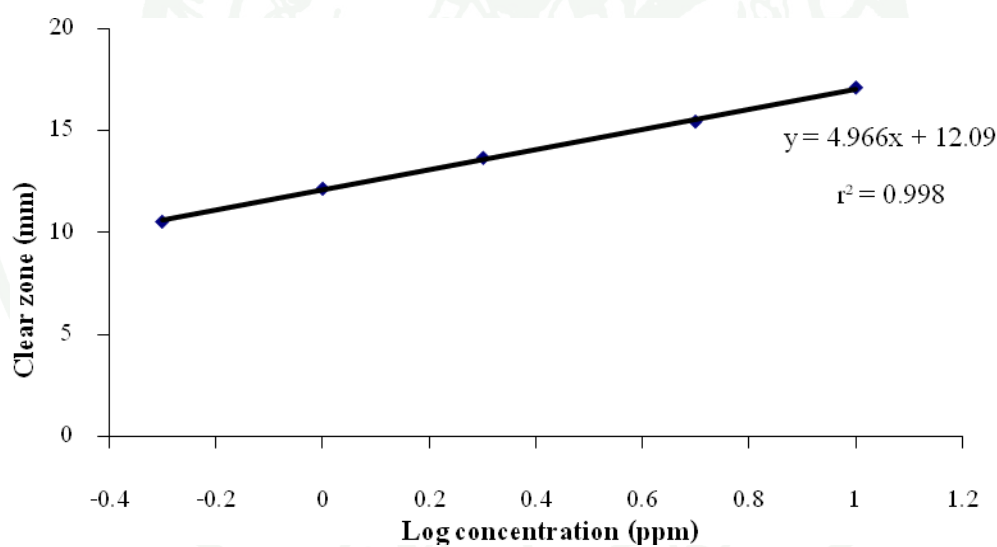


(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 27 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 9

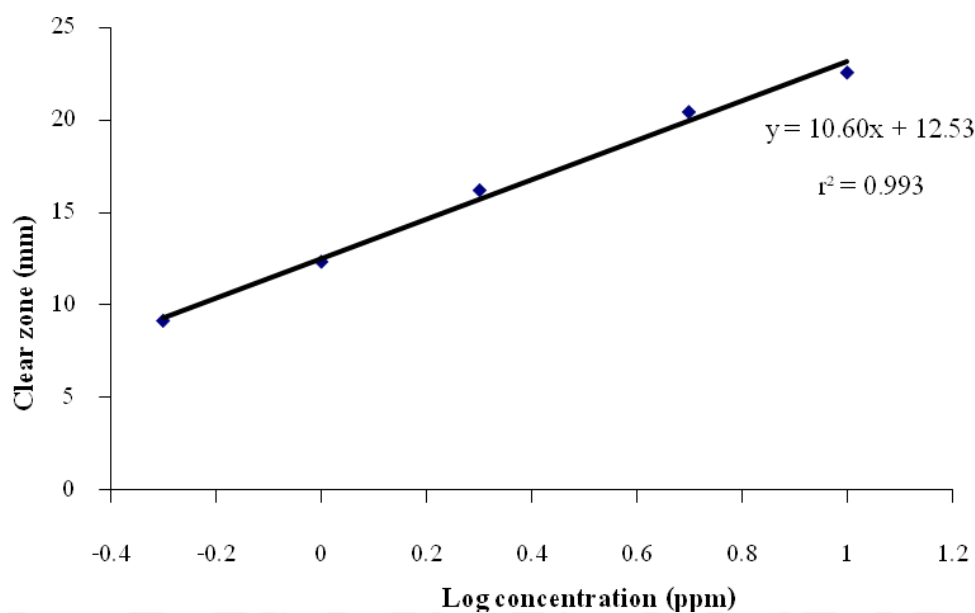


(ก) เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

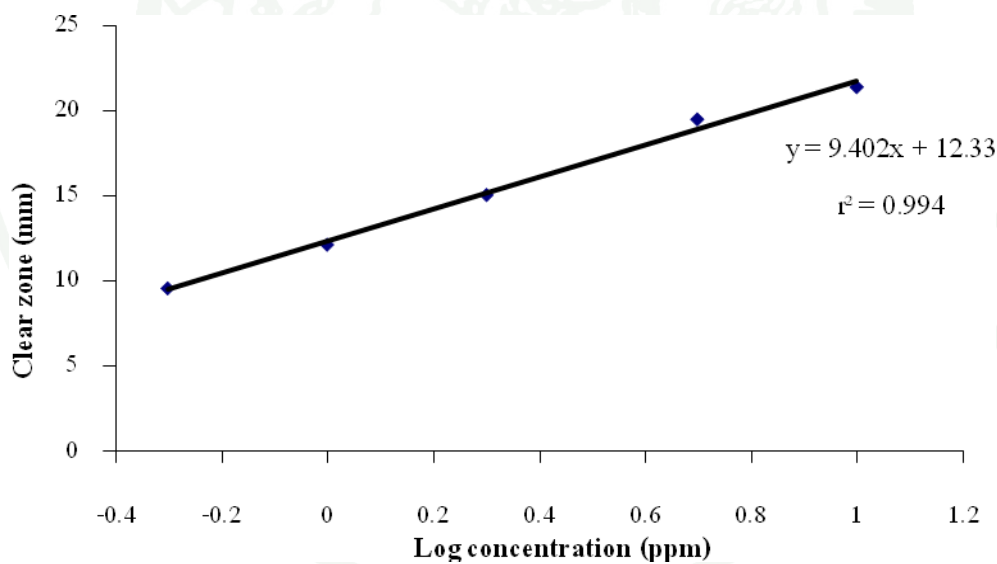


(ข) เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 28 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 10

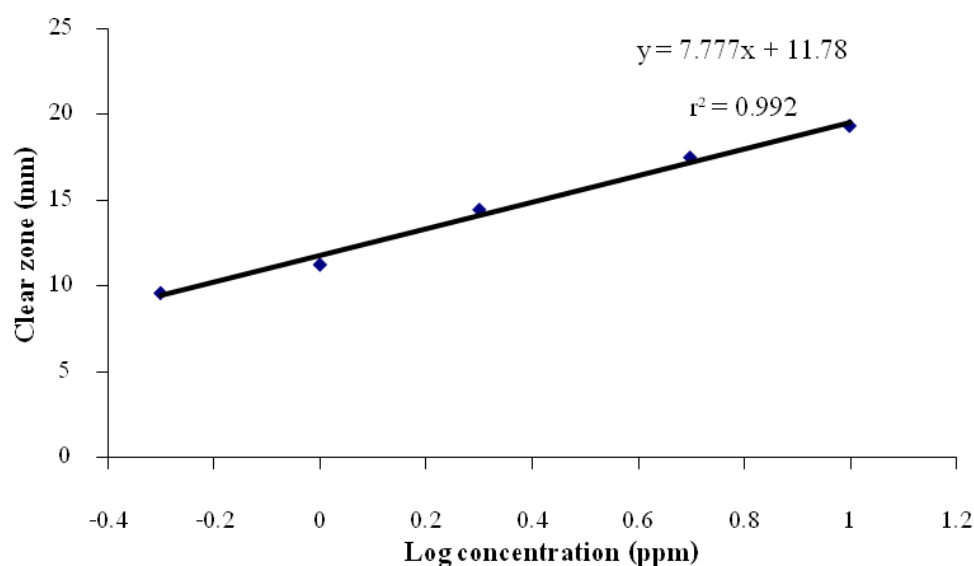


(ก) เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

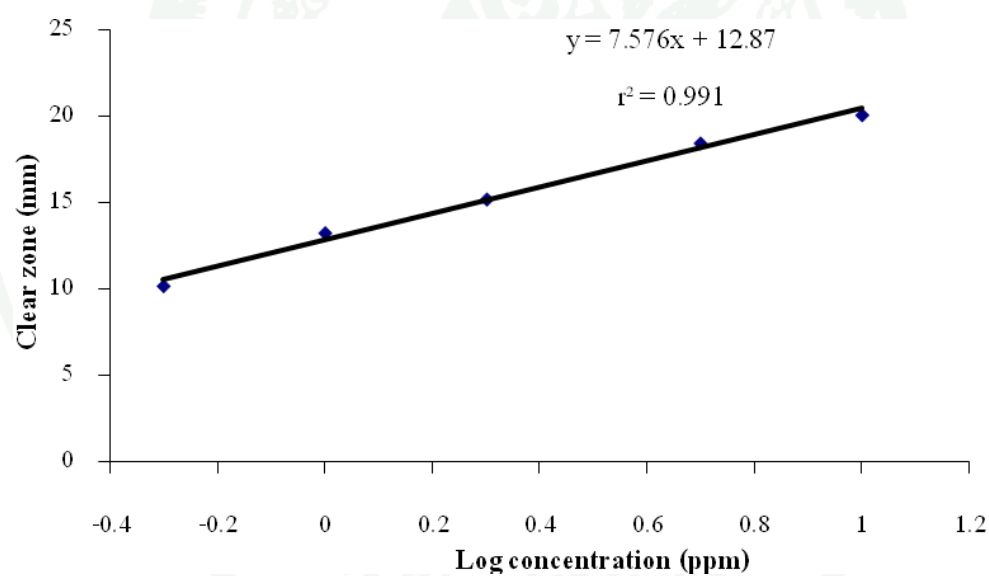


(ข) เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 29 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 11



(ก)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



(ข)เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินที่เก็บสปอร์ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ 30 เส้นตรงมาตรฐานของยาเจนด้ามัยซินเดือนที่ 12

ตารางผนวกที่ 2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) (Difco)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) (Difco) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย	
Meat infusion	2.0 g
Casein hydrolysate	17.5 g
Starch	1.5 g
Agar	15.0 g

ตารางผนวกที่ 3 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Antibiotic medium 5 agar (Difco)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Antibiotic medium 5 agar (Difco) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย	
Pancreatic digest of gelatin	6.0 g
Yeast extract	3.0 g
Beef extract	1.5 g
Agar	15.0 g

ตารางผนวกที่ 4 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) (Difco)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB)(Difco) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย	
Tryptone	5.0 g
Soytone	5.0 g
Sodium chlorine	5.0 g

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาววรางคณา กังวานสุภพันธ์
วัน เดือน ปีเกิด	12 มกราคม 2529
สถานที่เกิด	สุรินทร์
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(สัตวศาสตร์) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ (พ.ศ.2551)
ผลงานทางวิชาการ	- หัวข้อเรื่อง Effect of <i>Bacillus subtilis</i> spore storage on microbioassay for determination of antimicrobials เสนอภาคโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ The 37 th Congress on Science and Technology of Thailand - หัวข้อเรื่อง Optimized elution of cefazolin from calcium sulfate beads เสนอภาคโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ The 37 th International Conference on Veterinary Science 2011
ทุนสนับสนุนการวิจัย	KasetsartUniversity Research and Development Institute (KURDI), Thailand in 2011.