

แบบแผนการดื้อยา และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *Shigella* spp. ในประเทศไทย

Resistant Patterns and Minimal Inhibitory Concentration of Antimicrobial Agent Against of *Shigella* spp. in Thailand

อรุณ บำรุงกุลนนท์¹ เยาวภา เจิงกลิ่นจันทน์² ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์¹ และ สุมาลี บุญมา³

Aroon Bangtrakulnonth, Jaowapa Jerngklinchan,

Srirat Pornrungwong, and Sumalee Boonmar

ABTRACT

In-vitro drug resistant patterns and Minimal Inhibitory Concentration 9 antimicrobial agents against of 4 serovars of *Shigella* spp. were determined. Two hundred strains obtained from WHO National Salmonella and Shigella Center consisting of *Shigella dysenteriae* (21 strains), *Shigella flexneri* (83 strains), *Shigella boydii* (20 strains) and *Shigella sonnei* (76 strains) were used. The tested drugs were Ampicillin (AM), Cefazolin (CZ), Trimethoprim - Sulfamethoxazole (TMP-SMX), Chloramphenicol (C), Tetracycline (TC), Ofloxacin (OFX), Nalidixic acid (NA), Streptomycin (SM) and Kanamycin (K).

All isolates tested were 100, 100, 98.5 and 97.5 % sensitive to OFX, CZ, K and NA respectively. Resistance to AM, C, TC, TMP-SMX, and SM were in the ranges of 9.2 - 90.5 %. Most of the strains except 11 strains of *Shigella sonnei*, 7 strains of *Shigella boydii* and 4 strains of *Shigella flexneri* were resistant to at least 1 drug. Multiple drug resistance was more common than single resistance. MIC of OFX and CZ were in the ranges of 0.03 - 0.125 µg/ml and 1-4 µg/ml while MIC₅₀ and MIC₉₀ were 0.06, 0.125 µg/

¹ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Bangkok 10900, Thailand.

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department of Pathology, Microbiology Section, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.

³ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

ml and 2, 2 µg/ml respectively. MIC for SM, TC, C and AM were in the ranges of 1-64 µg/ml MIC₅₀ and MIC₉₀ for the most of 4 drug resistant strains were 64 and 64 µg/ml. However MIC₅₀ and MIC₉₀ for TMP - SMX were 16 and 16 µg/ml.

Key words : *Shigella* spp, drug resistance, MIC, antimicrobial agents

บทคัดย่อ

ศึกษาแบบแผนการดื้อยา และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพ (MIC) จำนวน 9 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Shigella* spp. จำนวน 200 สายพันธุ์ 4 subgroup จากศูนย์ WHO National Salmonella and Shigella Center กองพยาธิวิทยาคลินิก ซึ่งประกอบด้วย *Shigella dysenteriae* (21 สายพันธุ์) *Shigella flexneri* (83 สายพันธุ์) *Shigella boydii* (20 สายพันธุ์) และ *Shigella sonnei* (76 สายพันธุ์) สารต้านจุลชีพที่ใช้คือ Ampicillin (AM), Cefazolin (CZ), Trimethoprim - Sulfamethoxazole (TMP - SMX), Chloramphenicol (C), Tetracycline (TC), Ofloxacin (OFX), Nalidixic acid (NA), Streptomycin (SM) และ Kanamycin (K).

ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Shigella* ทุกสายพันธุ์ไวต่อ OFX และ CZ ถึง 100% และไวต่อ K และ NA 98.5 และ 97.5% ตามลำดับ เชื้อทุกสายพันธุ์จะดื้อต่อ AM, C, TC, TMP-SMX และ SM อยู่ในช่วง 9.2 - 90.5 % เชื้อทุกสายพันธุ์ยกเว้น *Shigella sonnei* (11 สายพันธุ์), *Shigella boydii* (7 สายพันธุ์) และ *Shigella flexneri* (4 สายพันธุ์) จะดื้อต่อยาอย่างน้อย 1 ชนิด รูปแบบการดื้อยาส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะดื้อต่อยาหลายชนิด ค่า MIC ของ OFX และ CZ จะอยู่ในช่วง 0.03-0.125 µg/ml และ 1-4 µg/ml และค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ จะเท่ากับ 0.06, 0.125 µg/ml และ 2, 2 µg/ml ตามลำดับ ส่วนค่า MIC ของ SM, TC, C และ AM จะอยู่ในช่วง 1-64 µg/ml ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของสารต้านจุลชีพ 4 ชนิดต่อเชื้อส่วนใหญ่ที่ดื้อ จะ

เท่ากับ 64 และ 64 µg/ml ส่วน MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของ TMP - SMX เท่ากับ 16 และ 16 µg/ml.

คำนำ

ในประเทศที่กำลังพัฒนา มักจะประสบปัญหาทางด้านสาธารณสุขด้วยสาเหตุของโรคบิด (Shigellosis หรือ bacillary dysentery) ซึ่งเป็นโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อในกลุ่ม *Shigella* ทำให้เกิดการปวดท้อง อุจจาระร่วงอย่างรุนแรง และถ่ายเป็นมูกเลือด (Ketchum, 1988) ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุจากการรับประทานอาหาร หรือดื่มน้ำที่มีเชื้อ *Shigella* spp. ปนเปื้อนอยู่ โดยเชื้อจะไปเจริญในบริเวณเยื่อลำไส้ ทำให้เยื่อลำไส้เป็นแผลอักเสบมีเลือดออก สาเหตุของอาการอุจจาระร่วงอาจมีผลมาจากเอ็นโดท็อกซินของ *Shigella* นั้นเอง (Levinson and Jawetz, 1992) ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้

การระบาดของโรคบิดในประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2518 เป็นต้นมา อัตราการเกิดโรคบิดในปี พ.ศ. 2513 มีเพียง 13 ราย ต่อประชากร 1 แสนคน แต่ในปี พ.ศ. 2525, 2527-2530 อัตราการเกิดโรคบิดเพิ่มขึ้นเป็น 67, 113, 126, 155 และ 248 คน ต่อประชากร 1 แสนคน ตามลำดับ (กุล และปฐมพิศ, 2533) ส่วนประเทศที่กำลังพัฒนาบางประเทศ เช่น อินเดีย บังกลาเทศ พม่า ลาว (Bennish et al., 1992) ตลอดจนประเทศไทยพบว่ามีการระบาดของ *Shigella* บางพื้นที่ในอัตราที่สูง ซึ่งจะพบโรคนี้ในเด็กเล็กที่มีอายุต่ำกว่า 5 ปี เนื่องจากประเทศเหล่านี้ยังขาดระบบสาธารณสุขที่ดี

ในการรักษาโรคบิดนั้น การเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมจะสามารถรักษาโรคได้ ดังนั้นการทดสอบความไวของเชื้อก่อโรคต่อสารต้านจุลชีพ นับว่ามีความสำคัญที่จะช่วยให้แพทย์ ใช้ในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เนื่องจากในระยะหลังได้ตรวจพบเชื้อก่อโรคต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นเป็นผลทำให้เกิดความยุ่งยาก ในการเลือกใช้ในการรักษาโรค จุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้ก็เพื่อจะศึกษาแบบแผนของการดื้อยาและค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ *Shigella* spp. ในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

1.1 เชื้อที่ใช้ในการศึกษา : ใช้เชื้อ *Shigella* จำนวน 200 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Shigella dysenteriae* (21 สายพันธุ์), *Shigella flexneri* (83สายพันธุ์), *Shigella boydii* (20สายพันธุ์) และ *Shigella sonnei* (76สายพันธุ์) จากศูนย์ WHO National Salmonella and Shigella Center กองพยาธิวิทยาคลินิก ซึ่งได้รวบรวมไว้ในระหว่างปี 2535 - 2538

1.2 สารต้านจุลชีพ : ใช้ยาต้านจุลชีพจำนวน 9 ชนิด คือ Ampicillin (AM), Cefazolin (CZ), Trimethoprim-Sulfamethoxazole (TMP-SMX) Chloramphenicol (C), Tetracycline (TC), Ofloxacin (OFX), Nalidixic acid (NA), Streptomycin (SM) และ Kanamycin (K) ความเข้มข้นของยาที่ใช้ทดสอบ แสดงไว้ (Table 1)

2. วิธีการ

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Mininal Inhibitory Concentration, MIC) โดยวิธีของ Balows (1991).

จากการทดลองพบว่ายา OFX และ CZ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ถึง 100 % ส่วน K และ NA มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของ *Shigella* ได้ถึง 98.5 และ 97.5% และพบว่า *Shigella* ทั้ง 4 กลุ่ม คือต่อ AM, C, TC, TMP-SMX และ SM อยู่ในช่วงร้อยละ 9.2-90.5 ซึ่งยาแต่ละชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง เท่ากับ 40.5, 49.5, 67.5, 48 และ 73% ตามลำดับ (Table 2)

การศึกษาค่า MIC ดังแสดงใน (Table 3) พบว่าค่า MIC ที่ 50% และ 90 %ของ OFX และ CZ ต่อ *Shigella*

Table 1 Type and concentration of antimicrobial agents for testing resistant of *Shigella* spp.

Antimicro - bial agent	Purity of drugs	Solution	Concentration of stock drug(mg/ml)	concentration of antimicrobial agents (mg / ml)
AM	98	0.1M Buffer pH8	640	.03, .06, .125, .25, .5, 1, 2, 4, 8, 16, 32,64
C	100	Methanol	640	.03, .06, .125, .25, .5, 1, 2, 4, 8, 16, 32,64
TC	99.2	0.1 M HCl	640	.03, .06, .125, .25, .5, 1, 2, 4, 8, 16, 32,64
NA	100	0.1 M NaOH	640	.03, .06, .125, .25, .5, 1, 2, 4, 8, 16, 32,64
OFX	99.1	0.1 M NaOH	160	.008, .016, .03, .06, .125, .25,.5, 1, 2, 4, 8,16
TMP-SMX	100	0.05 M HCl	160	.008, .016, .03, .06, .125, .25,.5, 1, 2, 4, 8,16
K	78.2	0.1M Buffer pH8	640	.03, .06, .125, .25, .5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
SM	750 unit/mg	0.1M Buffer pH8	640	.03, .06, .125, .25, .5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
CZ	95.4 %	water	640	.03, .06, .125, .25, .5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64

spp. เท่ากับ 0.06, 0.125, และ 2, 2 µg/ml ส่วนยา NA และ K จะมีค่า MIC ที่ 50 % และ 90% ในแต่ละสายพันธุ์ดังนี้ *S. dysenteriae* เท่ากับ 2, 2 และ 2, 8 µg/ml *S. flexneri* เท่ากับ 2, 4 และ 8, 8 µg/ml และ *S.*

boydii เท่ากับ 2, 2 และ 4, 8 µg/ml และ *S. sonnei* เท่ากับ 2, 2 และ 8, 16 µg/ml ตามลำดับ

ส่วนยาชนิดอื่นๆ คือ SM, TC, AM, และ C มีค่า MIC อยู่ในช่วง 1 - >64 µg/ml โดยเชื้อที่ดื้อต่อยา

Table 2 Resistant percentages of 9 antimicrobial agents against 200 strains of *Shigella* spp. : *S.dysenteriae* (21 strains), *S. flexneri* (83), *S. boydii* (20) and *S.sonnei* (76).

Antimicrobial agents	Number of resistant strains				Mean (X) %
	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>	
AM	0	71 (85.50)	3 (15)	7 (9.20)	40.5
C	16 (76.20)	69 (81.90)	3 (15)	11 (14.50)	49.5
TC	19 (90.50)	73 (87.95)	10 (50)	33 (43.40)	67.5
NA	0	3 (3.60)	0	0	1.5
OFX	0	0	0	0	0
TMP-SMX	10 (47.60)	47 (56.60)	5 (25)	34 (46.00)	48.0
K	0	4 (4.82)	1 (5)	4 (5.26)	4.5
SM	5 (23.80)	71 (85.50)	10 (50)	60 (78.90)	73.0
CZ	0	0	0	0	0

Table 3 Minimal Inhibitory Concentration of antimicrobial agents against 50% and 90% of *Shigella* spp.

Antimicrobial agents	<i>S. dysenteriae</i> (21)*		<i>S. flexneri</i> (83)*		<i>S.boydii</i> (20)*		<i>S. sonnei</i> (76)*	
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₅₀	MIC ₉₀
AM	4	4	>64	>64	4	64	4	8
C	>64	>64	64	64	2	64	64	64
TC	>64	>64	64	64	32	64	4	64
NA	2	2	2	4	2	2	2	2
OFX	0.06	0.125	0.06	0.125	0.06	0.125	0.06	0.125
TMP-SMX	2	16	16	16	0.125	16	1	16
K	2	8	8	8	4	8	8	16
SM	2	>64	64	64	>64	>64	> 64	64
CZ	2	2	2	2	1	2	1	2

* Number of tested strains 1

MIC₅₀ Minimal concentrations of antimicrobial agents (µg/ml) in resistance to 50% of *Shigella* spp.

MIC₉₀ Minimal concentrations of antimicrobial agents (µg/ml) in resistance to 90% of *Shigella* spp.

4 ชนิดดังกล่าวมีค่า MIC เท่ากับ >64 คิดเป็นร้อยละ 73, 67.5, 40.5 และ 49.5 ตามลำดับ ส่วนยา TMP-SMX มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.03 - >16 µg/ml และที่ค่า MIC >16 ของ TMP-SMX ต่อเชื้อชนิดนี้คิดเป็นร้อยละ 48 และพบว่า *S. dysenteriae* จำนวน 4 สายพันธุ์ จะต้านยา จำนวน 4 ชนิด ส่วน *S. flexneri* จะต้านยา มากที่สุด คือ 7 ชนิด ส่วน *S. boydii* และ *S. sonnei* จะต้านยา 6 ชนิด เท่ากัน (Table 4)

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาแบบแผนความไวของสารต้านจุลชีพ 9 ชนิดต่อเชื้อ *Shigella* spp. พบว่า ทุกสายพันธุ์ไม่ดื้อต่อยา CZ และ OFX ส่วน K และ NA มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ค่อนข้างสูงตรงกับรายงานของ Ling *et al.* (1988) และจากการศึกษาค่า MIC ของ NA, K, CZ และ OFX

จะมีค่าค่อนข้างต่ำถึงต่ำมาก ซึ่งตรงกับรายงานของ Goossen *et al.* (1985) พบว่าค่า MIC สำหรับยาในกลุ่ม quinolones มีค่าอยู่ในระดับต่ำ

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อดื้อต่อยา SM, TC, C, AM และ TMP-SMX ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงและมีค่า MIC ของยา 5 ชนิด ในระดับสูงกว่าปกติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Panigrahi *et al.* (1987) ที่พบว่าค่า MIC สูงกว่าจากเดิม การทดสอบยาต้านจุลชีพ 4 ชนิดอยู่ในช่วง 50-1,000 µg/ml เมื่อทดสอบกับ SM ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 25 µg/ml ส่วน C, TC และ AM มีค่า MIC อยู่ในช่วง 100-1,000 µg/ml ทั้งนี้ในปี ค.ศ. 1988 องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้มีการใช้ AM, TMP-SMX และ NA ในการรักษาโรคบิดแต่สำหรับในประเทศไทยพบว่าจะมีการระบาดของเชื้อที่ดื้อต่อยา AM, TMP-SMX โดยเชื้อจะไวต่อยาทั้งสองชนิดนี้เพียง 5-35 % เท่านั้นรวมถึง *S. dysenteriae* type 1 ที่ดื้อต่อยา AM มีค่า MIC สูงกว่าปกติ อาจมีผลมาจากมีการใช้ยา

Table 4 Resistant pattern of Antimicrobial agents against *Shigella* spp.

Number of drugs	<i>S.dysenteriae</i>		<i>S.flexneri</i>		<i>S.boydii</i>		<i>S.sonnei</i>	
	R	N	R	N	R	N	R	N
1	1	5	1	5	1	5	1	24
2	1	5	3	5	2	4	6	7
3	2	7	2	3	1	1	3	27
4	1	4	2	29	1	1	2	3
5	-	-	1	35	1	1	1	1
6	-	-	2	5	1	1	1	3
7	-	-	1	1	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of sensitive strains	-	-	-	4	-	7	-	11

R Number of resistant patterns

N Number of resistant strains

ในการรักษาโรคโดยใช้ขนาดของยาไม่เหมาะสมคือความเข้มข้นต่ำเกินไปหรือระยะเวลาในการใช้ยาน้อยเกินไป ไม่เพียงพอที่จะฆ่าเชื้อได้หมด ตลอดจนมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมของเชื้อ รวมถึงเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิดด้วย

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อที่ถูกยับยั้งด้วยความเข้มข้นสูง นั่นคือมีค่า MIC สูง ซึ่งแสดงว่าเชื้อคือยามากขึ้น ส่วนยาในกลุ่ม quinolones มีค่า MIC ต่ำ โดยเชื้อยังไวต่อยาในกลุ่มนี้อยู่ ดังนั้นการเลือกใช้ยารักษาผู้ป่วยโรคบิด เนื่องจากเชื้อ *Shigella* ในปัจจุบันยาในกลุ่ม quinolones เป็นยาที่ใช้ในการรักษาที่ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- กุล โบราณินทร์ และปทุมพิศ วิมลวัตรเวที. 2533. สถานการณ์เชื้อชigelล่าในประเทศไทยคือต่อสารต้านจุลชีพ. ว.กรมวทยา.พ. 2:113-194.
- Balowes, A. 1991. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 375 p.
- Bennish,M.L.,M.L. Salam, M.A.Hossain, J.Myaux, E.H.Khan, J.Chakraborty, F.Henry, and C.Ronsmans. 1992. Anti-microbial resistance of *Shigella* isolates in Bangladesh, 1983 - 1990. Increasing frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid. Clin Infect Dis. 14:1055-60.
- Goossens, H.,P.De Mol, H.Coignan, J.Levy, O.Grados, G.Ghysels, H.Innocent, and J.P.Butzler. 1985. Comparative *In vitro* activities of aztreonam, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, HR 810 (a new cephalosporin) RU289 (a new Microlide) and other agents against enteropathogens. Antimicrob Agents Chemother. 27:388-392.
- Ketchum, P.A. 1988. Microbiology Concepts and applications. New York, John Wiley and son. 112 p.
- Levinson, W.E., and E. Jawetz. 1992. Medical Microbiology and Immunology, 2nd edition New Jersey, Printice Hall International Inc. 1125 p.
- Ling,J.,KM.Kam, A.W.Lam, and G.L.French. 1988. Susceptibility of Hong Kong isolates of multiply resistant *Shigella* spp. to 25 antimicrobial agents, including ampicillin plus sulbactam and new 4-quinolones. Antimicrob Agents Chemother.32:20-23.
- Panigrahi,D.,K.C.Agarwal, A.D.Verma, and M.L.Dubey. 1987. Incidence of Shigellosis and multi-drug resistant *Shigellae* : A10 year study. J Trop Med Hyg. 90:25-29.