

## การเสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพเพื่อรักษา โรคติดเชื้อ Proteus mirabilis ที่ทำให้เกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง

อัญชลี คงฟู ภบ., M.S. (Microbiology) \*

### บทคัดย่อ

การเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพ Penicillins และ Aminoglycosides สามารถสังเกต  
เห็นได้ในสิ่งมีชีวิต เช่น หนูขาว ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ Proteus mirabilis อย่างรุนแรงขึ้น แล้ว  
จึงรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ ๖ ชนิด และแบบที่ผสมกัน ๔ คู่ ได้พบการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง  
ยาต้านจุลชีพอย่างชัดเจนมาก ในยาต้านจุลชีพ ๔ คู่ที่ศึกษาคือ Carbenicillin + kanamycin,  
carbenicillin + amikacin, ampicillin + kanamycin, และ ampicillin + amikacin  
ส่วนยาต้านจุลชีพอีก ๔ คู่ ให้ผลการเสริมฤทธิ์กันน้อย โดยผลที่ได้อาจเป็นเพียง Additive เท่านั้น  
อย่างไรก็ตาม ไม่พบการต้านฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพทั้งสองพวกเลย ฉะนั้นการใช้ยาต้านจุลชีพร่วม-  
กันจึงให้ผลในการรักษาโรคติดเชื้อ Proteus ได้ดีกว่าการใช้ยาต้านจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงลำพัง  
ชนิดเดียว

### บทนำ

ปัจจุบันนี้พบว่าเชื้อใน Family Entero-  
bacteriaceae ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วย  
ได้บ่อยมากที่สุด และเชื้อเหล่านี้เริ่มติดต่อยาค้าน  
จุลชีพที่นำมาใช้รักษาเป็นอย่างมากด้วย โดยเฉพาะ  
อย่างยิ่งเชื้อ Proteus เริ่มติดต่อยาค้านจุลชีพ  
Aminoglycosides ที่เคยใช้รักษาได้ผลดีมากก่อน  
ซึ่งระหว่าง species ต่างๆ ของ Proteus พบ  
ว่า Proteus mirabilis เป็น species ที่แยก

ได้บ่อยมากที่สุด เช่น จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่เข้า  
มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่<sup>๑</sup>  
ซึ่งเชื่อนี้มีผู้รายงานว่าเริ่มติดต่อยา Gentamicin  
และ Kanamycin เพิ่มบ่อยมากยิ่งขึ้น<sup>๒,๓</sup> ทั้งนี้  
เนื่องจากมีการสะสม R-plasmids ในเชื้อ จึง  
เป็นสาเหตุให้ต้องสังเคราะห์ยาต้านจุลชีพใหม่ๆ  
มาใช้เรื่อยๆ แต่วิธีการแก้ไขการดื้อของเชื้อต่อ  
ยาที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจอีกวิธีหนึ่ง คือการใช้ยา

\* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ร่วมกัน โดยเฉพาะการร่วมกันระหว่างยาพวก Penicillins และ Aminoglycosides ซึ่งจะให้ผลเสริมฤทธิ์กันต่อเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด<sup>๔,๕,๖</sup>

เนื่องจากผลที่เกิดขึ้นจากการร่วมกันของยาด้านจุลชีพ ๒ ชนิด มีได้หลายแบบ เช่น Indifference, addition, synergism หรือ antagonism ซึ่งผลเหล่านี้สามารถสังเกตเห็นได้ทั้งในการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ( In vitro tests ) หรือในสิ่งมีชีวิต ( In vivo tests ) แต่ไม่มีใครสามารถทำนายโดยอาศัยหลักทฤษฎีได้ก่อนว่า ด้านนำยาด้านจุลชีพมาใช้ร่วมกัน ผลที่ได้ควรเป็นอย่างไร แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ที่ต้องการให้เกิดขึ้นในการรักษา Infection คือ การเสริมฤทธิ์กัน หรือ Addition และหลีกเลี่ยงการต้านฤทธิ์กัน (Antagonism) ระหว่างยาด้านจุลชีพทั้งสอง ฉะนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาถึง effects ต่างๆ โดยเฉพาะการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาด้านจุลชีพ Penicillins และ Aminoglycosides ต่อเชื้อ Proteus mirabilis ที่ทำให้เกิด infection ขึ้นในสัตว์ทดลอง และศึกษาถึงกลไกในการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาด้านจุลชีพทั้ง ๒ พวกนั้น

#### วัสดุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย . การศึกษาในสัตว์ทดลองนี้

ได้เลือกใช้เชื้อ Proteus mirabilis (Indol-negative) ซึ่งแยกได้จากปัสสาวะของผู้ป่วยที่เข้ามารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ ซึ่งจากการทดสอบความไวโดยวิธี Single disk method<sup>7</sup> พบว่าเชื้อนี้ค่อนข้างไวต่อยาด้านจุลชีพต่างๆ หลายชนิด โดยเฉพาะ Penicillins และ Aminoglycosides ที่ศึกษา ซึ่งเชื้อนี้ได้เก็บสดจากไว้นอาหาร Mueller-Hinton Agar Slant (BBL) ที่ ๔°ซ และนำมา streak ลงบนอาหาร Blood Agar เพื่อให้แน่ใจว่าได้ Pure culture ก่อนการทดสอบทุกครั้ง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงต่อใน Mueller-Hinton Broth (MHB) เพาะเลี้ยงค้างคืนที่ ๓๗°ซ. และนำมาทำให้เจือจางด้วย MHB เพื่อปรับให้ได้จำนวนเชื้อประมาณ ๑-๒ x ๑๐<sup>๘</sup> เซลล์/มล. (เท่ากับ ๗ เท่าของ LD<sub>50</sub> ของเชื้อ strain นี้) ซึ่งเมื่อฉีดจำนวนเชื้อนี้เข้าช่องท้องหนูขาวประมาณ ๑ มล. จะทำให้หนูขาวทั้งหมดที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาด้านจุลชีพตายภายใน ๑๒ ชั่วโมง แต่ถ้าให้การรักษาด้วย ๒,๐๐๐ ยูนิตของ Penicillin G/Kg จะทำให้หนูขาวจำนวน ๑๐-๒๐% มีชีวิตรอดอยู่ได้อีกนาน

ยาด้านจุลชีพ . Sodium penicillin

G (Merck Sharp & Dohme), ampicillin sodium (Dumex), carbenicillin sodium (Beecham), gentamicin sulfate (Schering), kanamycin sulfate (Meiji), และ amikacin sulfate (Bristol) ถูกเตรียมขึ้นใช้ใหม่ๆ โดยใช้ Sterile phosphate buffer pH 6.5 สำหรับละลายยาพวก Penicillins และใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อสำหรับละลายยาพวก Aminoglycosides

สัตว์ทดลอง. ใช้หนูขาวที่ปราศจากโรคโดยเลือกหนูขาวตัวเมีย ที่มีอายุขนาด และน้ำหนักใกล้เคียงกัน ประมาณ ๒๕-๓๐ กรัม (  $\pm$  ๒ กรัม) เพื่อใช้สำหรับการทดสอบแต่ละครั้ง

การทำให้เกิด infection ในหนูขาว โดยแบ่งหนูขาวออกเป็นกลุ่มๆ ละ ๒๐ ตัว แต่ละกลุ่มจะได้รับการฉีดด้วยเชื้อ Proteus mirabilis ที่เตรียมไว้ เข้าช่องท้องหนูขาวทุกตัวก่อนในปริมาณ ๑ มล. และในเวลา ๒ ชม. ต่อมา จึงรักษาหนูขาวด้วยยาต้านจุลชีพ แบบเดี่ยวหรือผสมกัน ๒ ชนิด

การรักษาหนูขาวด้วยยาต้านจุลชีพ หลังจากทำให้เกิด infection ด้วยเชื้อ Proteus เป็นเวลา ๒ ชั่วโมงแล้ว จึงรักษาหนูแต่ละกลุ่มด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ๒ ชนิด คือ Penicil-

lin, ampicillin, carbenicillin, gentamicin, kanamycin, และ amikacin และแบบผสมกัน ๔ คู่ คือ Penicillin ผสมกับ gentamicin, หรือ kanamycin หรือ amikacin; Ampicillin ผสมกับ gentamicin, หรือ kanamycin หรือ amikacin และ Carbenicillin ผสมกับ gentamicin, หรือ kanamycin หรือ amikacin โดยหนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเพียง ๑ ชนิด หรือ ๑ คู่เท่านั้น โดยเลือกใช้ขนาดของยา

(Dose) ที่ต่ำที่สุด ซึ่งเมื่อฉีดยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ แต่ละชนิดเข้าหนูที่เกิด infection กลุ่มหนึ่งแล้ว จะทำให้หนูนั้นมีชีวิตเหลือรอดอยู่เพียง ๑๐-๒๐% ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า Dose ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดเป็นดังนี้: Penicillin G, ๒๐,๐๐๐ units/Kg; Ampicillin, ๓๐,๐๐๐ ug/Kg; Carbenicillin, ๑๕,๐๐๐ ug/Kg; Gentamicin, ๘๐๐ ug/Kg; Kanamycin, ๑,๖๐๐ ug/Kg; และ Amikacin, ๘๑๑ ug/Kg โดยการฉีดยาแต่ละชนิดเดี่ยวๆ เข้ากล้ามเนื้อของหนูในปริมาณ ๐.๕ มล. และสำหรับการใช้ยา ๒ ชนิดเพื่อรักษาหนูนั้นให้เสียชีวิตทั้งสองพร้อมกันโดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลังของหนู ข้างละชนิดๆ ละ ๐.๒๕ มล. และในการทดลองแต่ละครั้งทำได้ทำ

control เติมน้ำด้วย โดยนำหนูกุ่ม control จำนวน ๒๐ ตัวมาทำให้เกิด infection ด้วยเชื้อ Proteus เช่นเดียวกัน แล้วฉีด ๐.๕ มล. ของ ๐.๘๕% NaCl เข้ากล้ามเนื้อของหนูกุ่มนั้นแทนการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ แล้วสังเกตการมีชีวิตหรือการตายของหนูแต่ละกลุ่ม เป็นเวลา ๒ วัน และบันทึก Mortality rate หรือ Survival rate ที่เวลา ๖, ๑๒, ๒๔, ๓๖ และ ๔๘ ชั่วโมง ตามลำดับ

การหาเชื้อจากช่องท้องและจากเลือดในหัวใจหนู เพื่อเป็นการหาว่าการใช้ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดร่วมกัน จะช่วยทำให้เชื้อถูกทำลายไปอย่างรวดเร็วจากบริเวณที่ฉีดเชื้อเข้าหนู (ช่องท้อง) และจากเลือดในหัวใจหนูหรือไม่ ให้ใช้หนูขาวที่มีอายุ ขนาด และน้ำหนักใกล้เคียงกัน เช่นกันจำนวนประมาณ ๒๐๐ ตัว แบ่งออกเป็นกลุ่มๆ ละ ๑๒ ตัว ซึ่งหลังจากเวลา ๒ ชั่วโมงที่ฉีดเชื้อ Proteus เข้าช่องท้องหนูจำนวน ๑-๒  $\times$  ๑๐<sup>๗</sup> เซลล์แล้ว หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ ๑ ชนิด หรือ ๒ ชนิด พร้อมกัน หรือไม่ได้รับการรักษา (โดยฉีด ๐.๘๕%) NaCl เป็น control) จากนั้นนำเอาหนูแต่ละกลุ่มออกมาครั้งละ ๓ ตัว ที่เวลา ๒, ๖, ๑๐ และ ๒๔ ชั่วโมง หลังจากให้การรักษาแล้ว ตามลำดับ นำหนูที่เลือกไว้ออกมา

ฆ่าโดยให้ดม Ether แล้วผ่าหนูเพื่อดูเอาน้ำจากช่องท้องและเลือดจากหัวใจหนูออกมา นำมาทำการ culture หา Viable count โดยการทำการ Serial dilution ก่อน แล้วจึง pour plate กับอาหาร Trypticase soy agar และนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารหลังจากเพาะเลี้ยงที่ ๓๗°ซ. เป็นเวลา ๒๔-๔๘ ชั่วโมง ให้ทำกับหนูกุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ๖ ชนิด แบบผสมกัน ๔ คู่ และกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือแทนยาต้านจุลชีพเพื่อเป็น control

#### ผลการทดลอง

การที่เลือกใช้เชื้อ Proteus mirabilis เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กันในสัตว์ทดลอง เนื่องจากเชื้อ Proteus species นี้ เป็น species ที่แยกได้บ่อยมากจากปัสสาวะของผู้ป่วยที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลนครเชียงใหม่ นอกจากนี้จากการทดสอบความไวทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี Single disk method พบว่าเชื้อนี้ไวต่อยาต้านจุลชีพ Penicillin และ Amino-glycosides ทุกตัวที่ศึกษาและจากการทดสอบการร่วมกันระหว่างยา ๒ พวกนี้ ต่อเชื้อ Proteus strain นี้ในห้องปฏิบัติการ (In vitro) พบว่าให้ผลเสริมฤทธิ์กันเห็นได้อย่างชัดเจน ฉะนั้นจึงได้เลือกเชื้อ strain นี้ เพื่อศึกษาการ

เสริมฤทธิ์กันของยาต้านจุลชีพ ๒ พวกในสัตว์ทดลอง (In vivo) ด้วย นอกจากนี้ เชื้อนี้ยังเหมาะสมตรงที่ให้คุณสมบัติต่างๆ ทั้งทาง Physiological และ Biochemical properties ที่ค่อนข้าง typical ไม่เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ยังคง stable อยู่ได้นาน โดยจะให้ผลลบต่อการทดสอบ Indol, lysine decarboxylase, แต่ให้ผลบวกต่อ urease, phenyl alanine deaminase และ citrate utilization เชื้อนี้สามารถเคลื่อนที่ได้ เพราะมี Peritrichous flagella และมีการเจริญแบบแม่ (swarming) บนอาหาร Blood agar

สำหรับรูปที่ ๑ แสดง Percentage ของ Mortality rate ของหนูแต่ละกลุ่มที่ถูก challenge ด้วย P.mirabilis แล้ว ๒ ชั่วโมงและรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ หรือ ๒ ชนิดร่วมกัน หรือไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเลย โดยสังเกตการตายของหนูแต่ละกลุ่มที่เวลา ๔, ๘, ๑๒, ๒๔ และ ๔๘ ชั่วโมง หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อแล้วตามลำดับ ซึ่งพบว่าถ้าใช้ยาต้านจุลชีพไม่ว่า Penicillin หรือ Aminoglycosides ให้ตามลำดับเดี่ยวๆ เพื่อรักษาหนูที่เกิด infection นั้น จะได้ Mortality rate ไม่แตกต่างกันมากนัก เช่น Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยา penicillin, ampicillin, carbenicillin, gentamicin

kanamycin, amikacin หรือน้ำเกลือ จะเป็น ๔๓, ๔๖, ๔๐, ๓๕, ๔๐, ๓๓ หรือ ๑๐๐% ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะได้เลือกใช้ dose ยาแต่ละชนิดที่เป็นขนาดต่ำที่สุด ซึ่งเมื่อฉีดเข้าหนูแล้ว จะรักษาหนูให้มีชีวิตเหลือรอดอยู่เพียง ๑๐-๒๐% เท่านั้น แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่า หนูทั้งหมดที่ได้รับการรักษาด้วยยา carbenicillin + kanamycin หรือ carbenicillin + amikacin จะมีชีวิตรอดหมดทุกตัว (๑๐๐%) และถ้าใช้ยา ampicillin + kanamycin หรือ ampicillin + amikacin จะรักษาหนูให้มีชีวิตรอดอยู่ถึง ๕๐% ในขณะที่ยา ampicillin + gentamicin จะทำให้หนูมีชีวิตรอดอยู่ถึง ๖๐% เท่านั้น นอกจากนี้ พบว่า ถ้ารักษาหนูด้วย penicillin + gentamicin, penicillin + kanamycin หรือ carbenicillin + gentamicin จะทำให้หนูครึ่งหนึ่งยังคงมีชีวิตเหลือรอดอยู่ (๕๐%) ส่วนการใช้ยา penicillin + amikacin จะเสริมฤทธิ์กันน้อยมาก จึงรักษาหนูให้มีชีวิตเหลือรอดอยู่เพียง ๔๐% เท่านั้น ซึ่งทั้งหมดนี้ต้องใช้เวลาสังเกตถึง ๒ วัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อและให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแล้ว

การขจัดเชื้อจากช่องท้องและจากเลือดในหัวใจหนู. ผลจากการทำ Viable count เพื่อหาจำนวนของเชื้อ P.mirabilis จากน้ำช่องท้องหนู (Peritoneal fluid) และจากเลือด

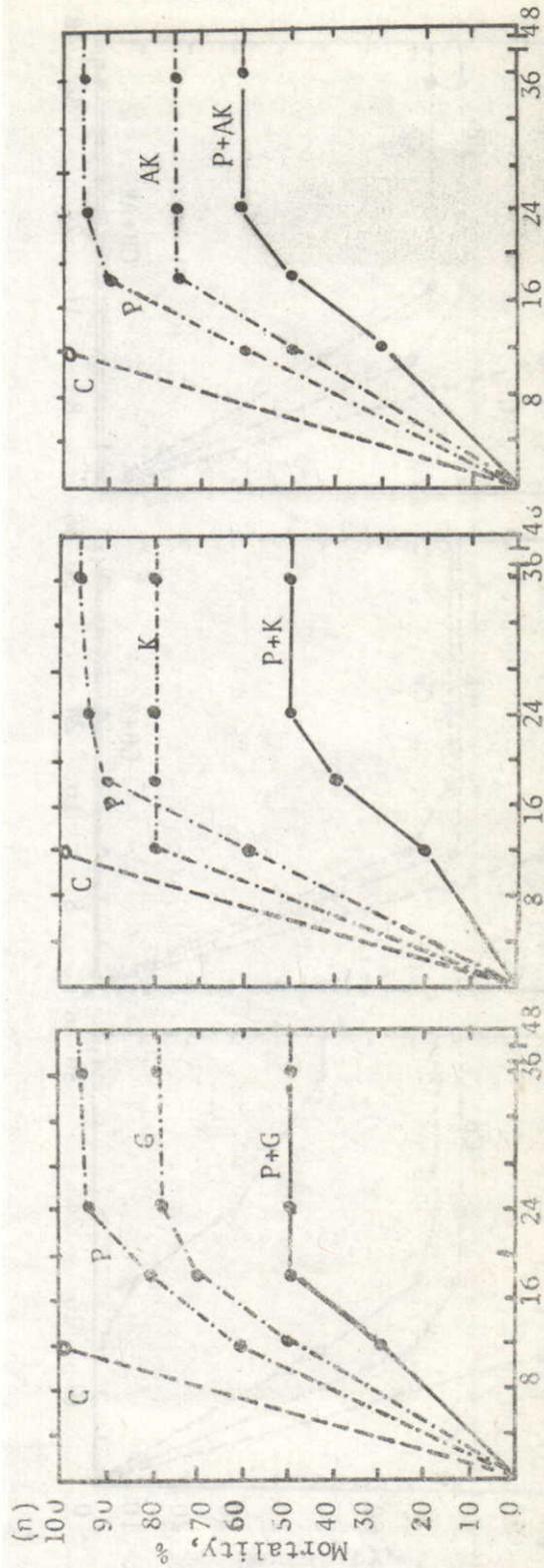
ในหัวใจหนู (Aorta blood) ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ ๑ ชนิด, หรือ ๒ ชนิดร่วมกัน หรือไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเลย (ให้น้ำเกลือแทน) ได้แสดงไว้ในรูปที่ ๒ และ ๓ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำช่องท้องหนูจากกลุ่มต่างๆ เช่น กลุ่ม control กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา ๑ ชนิด, หรือกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา ๒ ชนิด ระหว่าง penicillin + gentamicin, penicillin + kanamycin, penicillin + amikacin, carbenicillin + gentamicin และ ampicillin + gentamicin จะพบเชื้ออยู่ในช่วง  $10^7$  ถึง มากกว่า  $10^8$  เซลล์/มล. หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าไปแล้ว ๑๘-๒๔ ชม. ในทางตรงกันข้ามหนูกลุ่มที่รักษาด้วยยา carbenicillin + kanamycin, carbenicillin + amikacin, ampicillin + kanamycin หรือ ampicillin + amikacin จะพบเชื้อในช่องท้องน้อยกว่า  $10^7$  เซลล์/มล. หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อไปแล้ว ๑๘ ชม. และจำนวนจะค่อยๆ ลดลงตามลำดับจากเวลา ๒๔ ชม. โดยเฉพาะกับการรักษาด้วยยา carbenicillin + kanamycin หรือ carbenicillin + amikacin ซึ่งจะตรวจพบเชื้อแบคทีเรียในช่องท้องหนูเพียง  $10^2$  เซลล์/มล.

เท่านั้น

สำหรับรูปที่ ๓ แสดงจำนวนของเชื้อ *P. mirabilis* ที่แยกได้จากเลือดในหัวใจหนูจากกลุ่มต่างๆ หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อไปแล้ว ๒ ชั่วโมง และเก็บคร่าวเดียวกันกับการเก็บน้ำจากช่องท้องหนู หลังจากให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบต่างๆ ซึ่งพบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเลือดในหัวใจหนูจากกลุ่มต่างๆ คือ กลุ่ม control กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ทั้ง ๖ ชนิด หรือกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา ๒ ชนิดร่วมกัน ระหว่าง penicillin + gentamicin, penicillin + kanamycin, penicillin + amikacin, carbenicillin + gentamicin หรือ ampicillin + gentamicin จะพบจำนวนเชื้ออยู่ในช่วง  $10^7 - 10^8$  เซลล์/มล. หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อไปแล้ว ๑๘ ชม. ในทางตรงกันข้ามหนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยา carbenicillin + kanamycin, carbenicillin + amikacin, ampicillin + kanamycin หรือ ampicillin + amikacin จะพบเชื้อในเลือดจากหัวใจหนูลดน้อยลงมาก หรือ พบน้อยกว่า  $10^2$  เซลล์/มล. หลังจากที่ได้ challenge ด้วยเชื้อไปแล้ว ๑๘ ชั่วโมง.

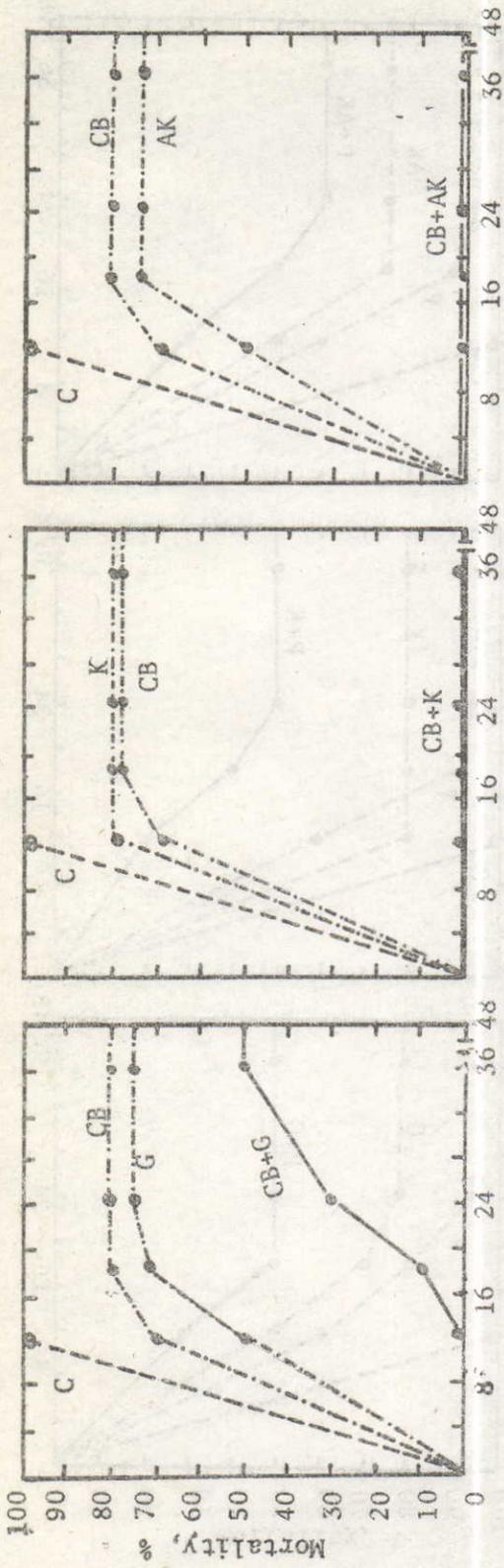
รูปที่ ๑. แสดง Mortality rate ของหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อ *Proteus mirabilis* และรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพ ๑ ชนิด, หรือ ๒ ชนิดผสมกัน หรือไม่ได้รักษา (ใช้น้ำเกลือเป็น Control)

- (ก) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ : Penicillin (P), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : P+G, P+K, และ P+AK และ Control (C)
- (ข) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ : Carbenicillin (CB), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : CB+G, CB+K, และ CB+AK, และ Control
- (ค) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ: Ampicillin (AM), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : AM+G, AM+K, และ AM+AK, และ Control

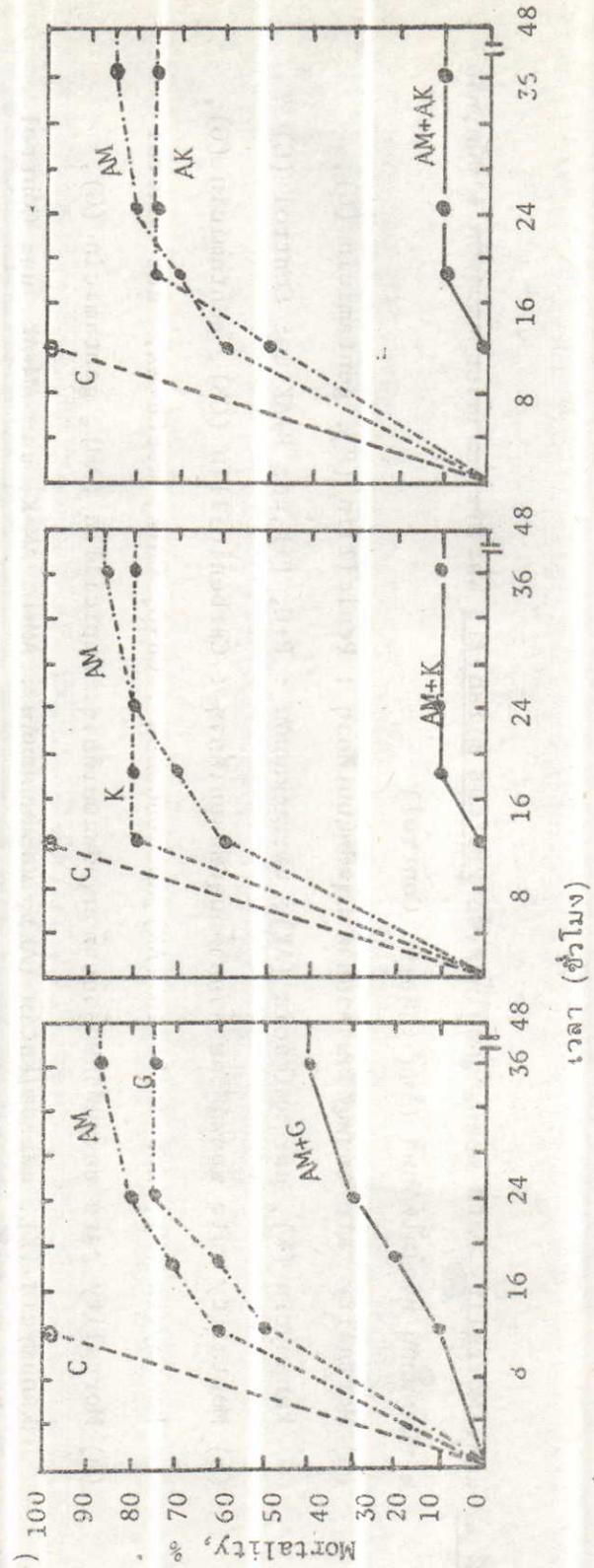


ภาพ (ซ้ายมือ)

(a)

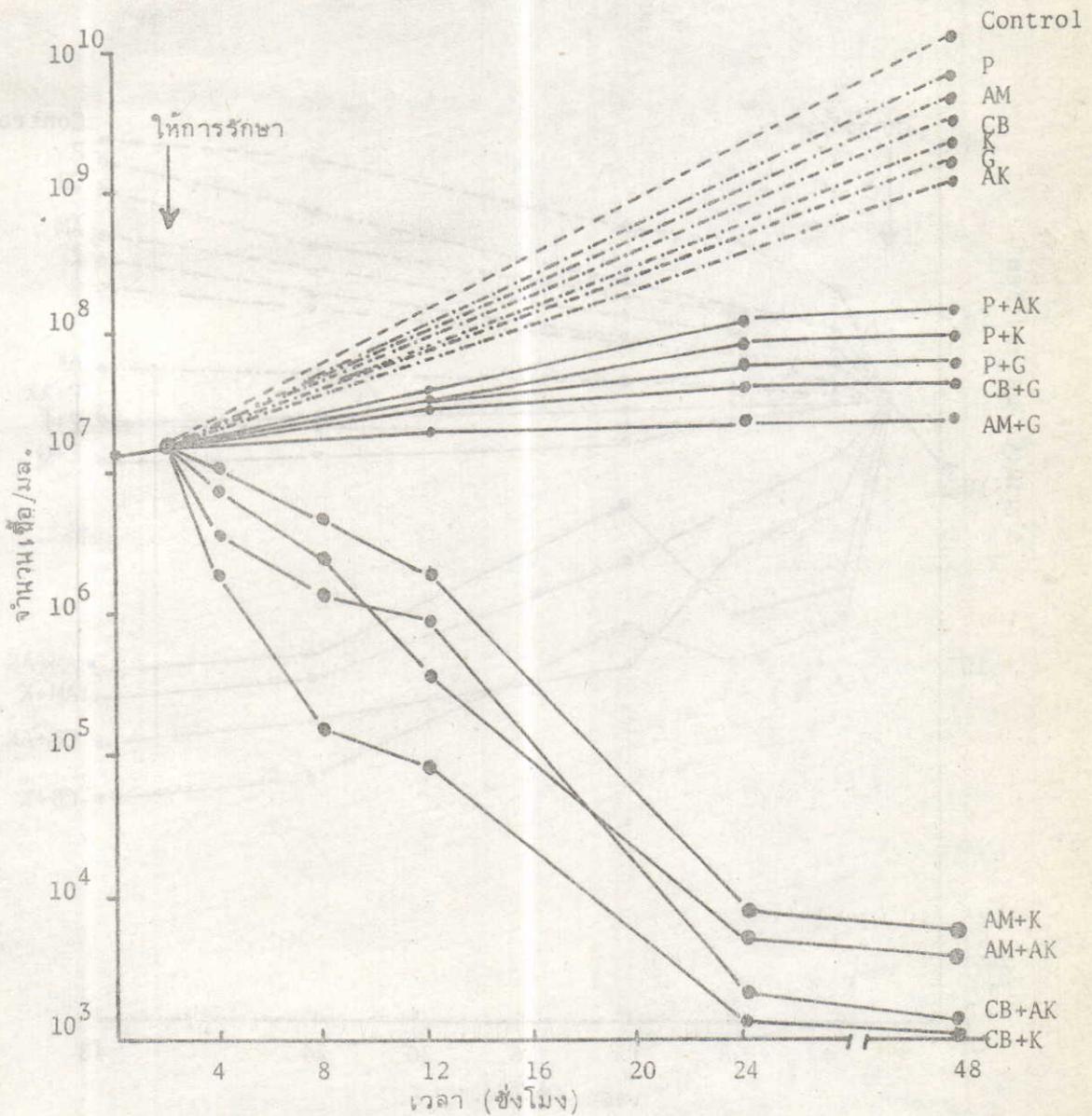


(b)

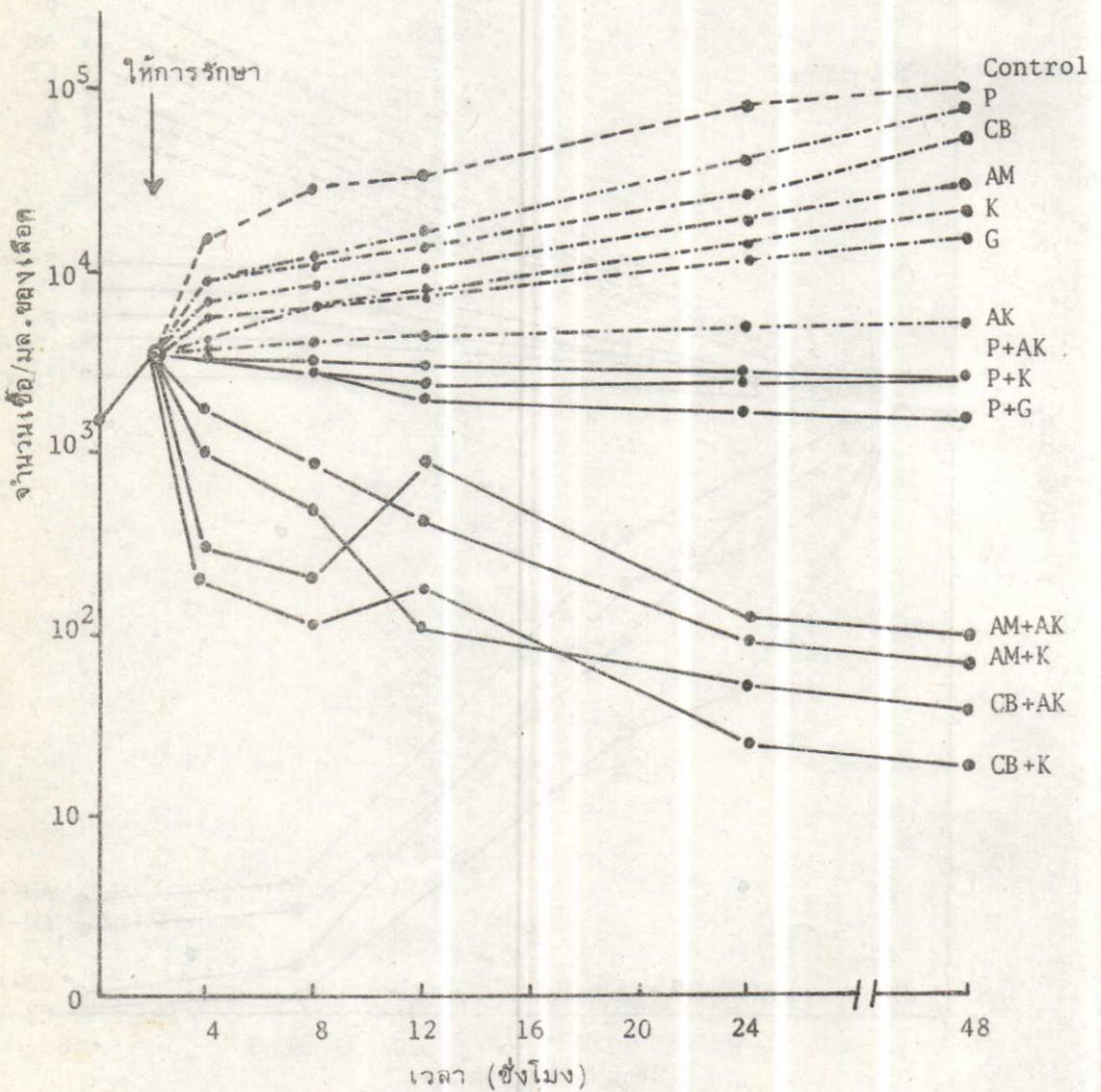


เวลา (ชั่วโมง)

รูปที่ ๒. แสดงจำนวนของเชื้อ Proteus mirabilis ที่แยกได้จากน้ำในช่องท้องหนู ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนู และอีก ๒ ชั่วโมงต่อมา จึงรักษาหนูด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยวๆ หรือผสมกัน และหนูกุ่ม Control ได้รับน้ำเกลือแทน

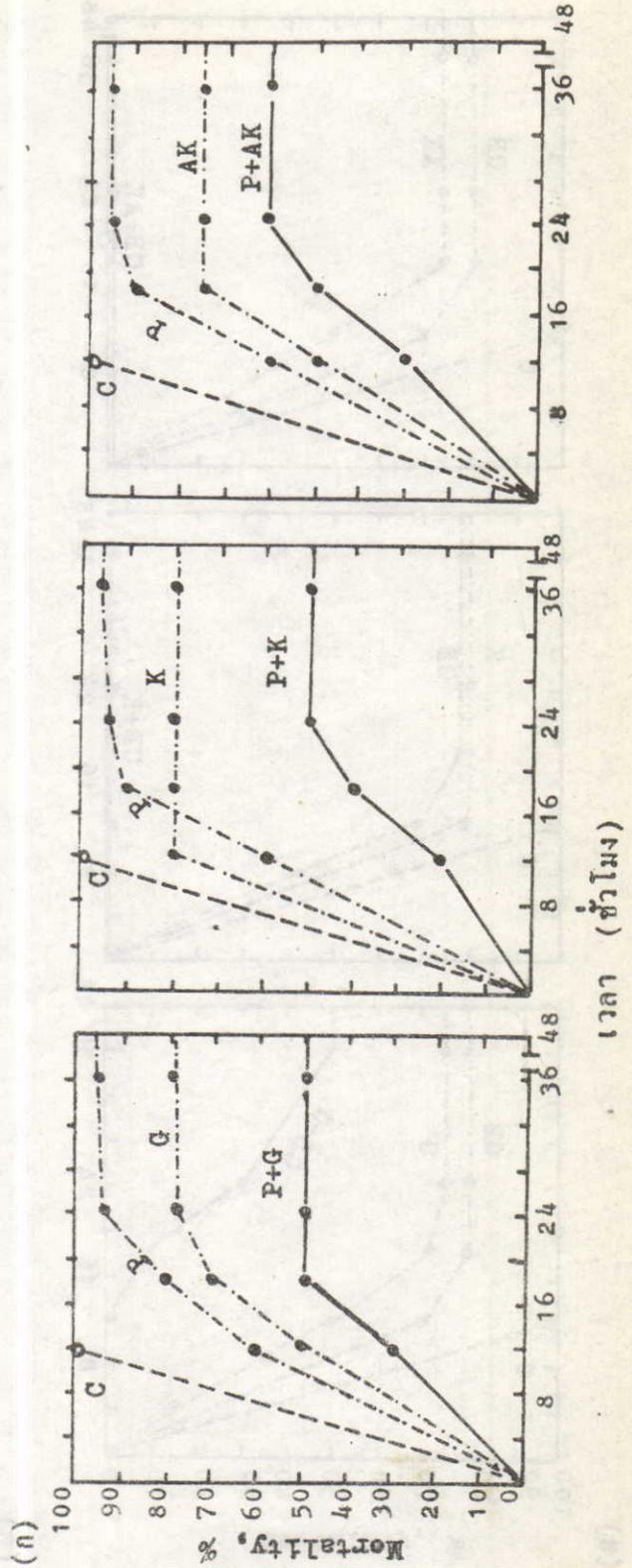


รูปที่ ๓. แสดงจำนวนของเชื้อ *Proteus mirabilis* ที่แยกได้จากเลือดในหัวใจหนู ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนู และอีก ๒ ชั่วโมงต่อมา จึงรักษาหนูด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยวๆ, หรือผสมกัน ส่วนหนูกลุ่ม Control ได้รับน้ำเกลือแทน

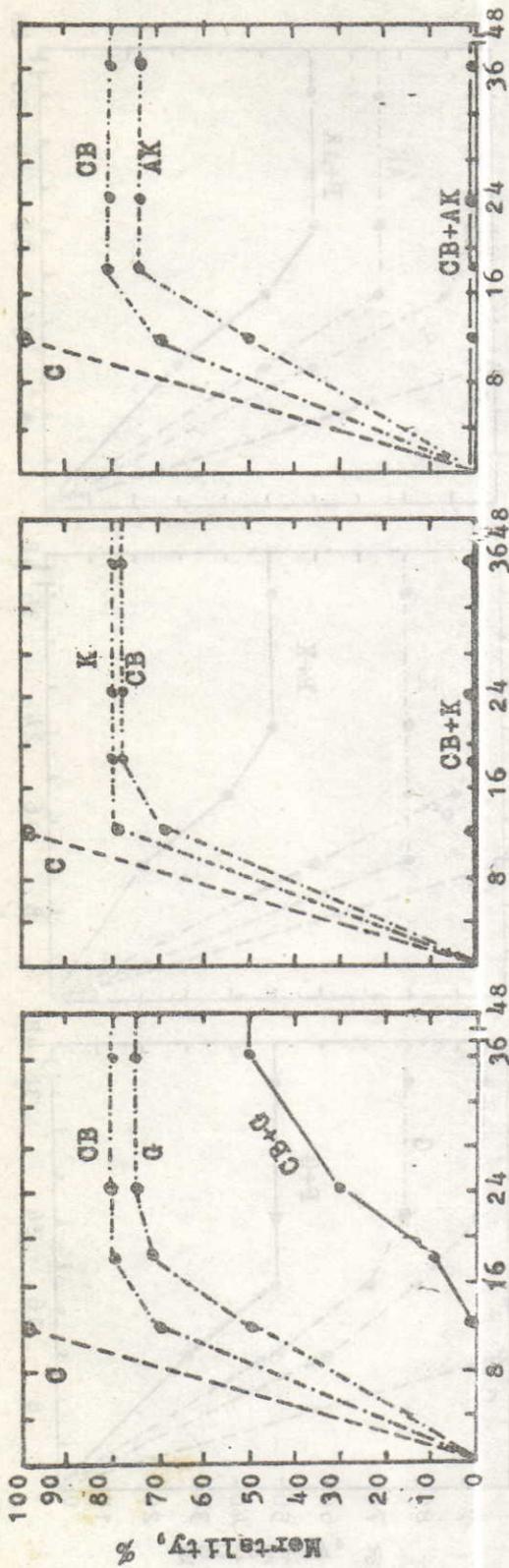


รูปที่ 1. แสดง Mortality rate ของหนูที่ถูกทำให้ติดเชื้อ *Proteus mirabilis* และรักษาต่อมาด้วยยาต้านจุลชีพ 1 ชนิด, หรือ 2 ชนิดผสมกัน หรือไม่รักษา (ในน้ำเกลือเป็น Control)

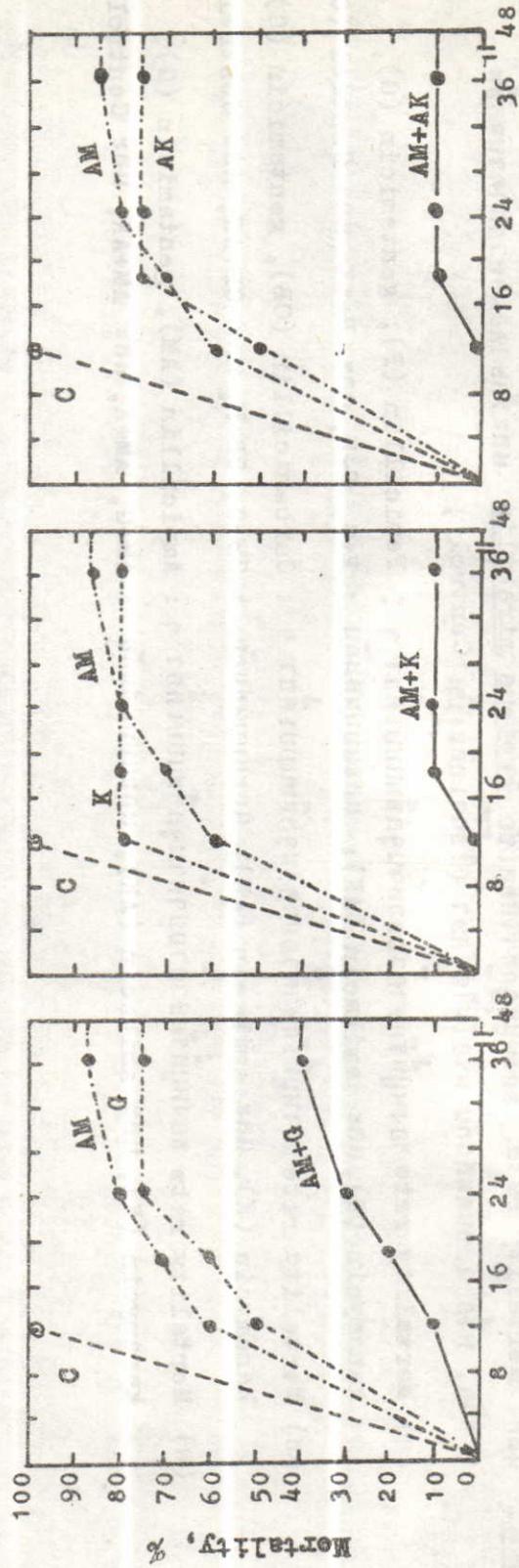
- (ก) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยว ๆ : Penicillin (P), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : P+G, P+K, และ P+AK และ Control (C)
- (ข) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยว ๆ : Carbenicillin (CB), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : CB+G, CB+K, และ CB+AK, และ Control
- (ค) Mortality rate ของหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยว ๆ : Ampicillin (AM), gentamicin (G), kanamycin (K), และ amikacin (AK); และแบบผสมกัน : AM+G, AM+K, และ AM+AK, และ Control



(B)

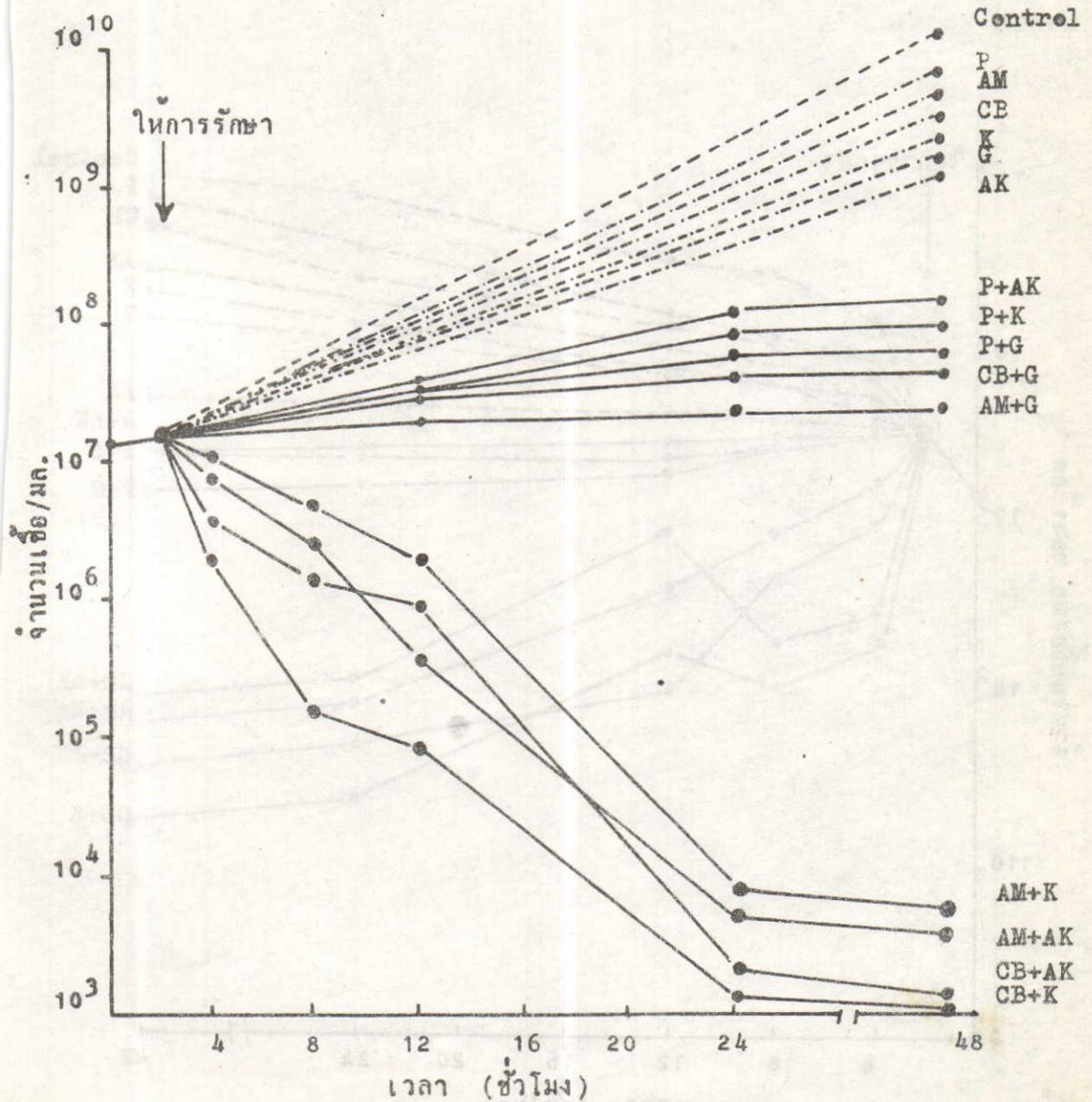


(A)

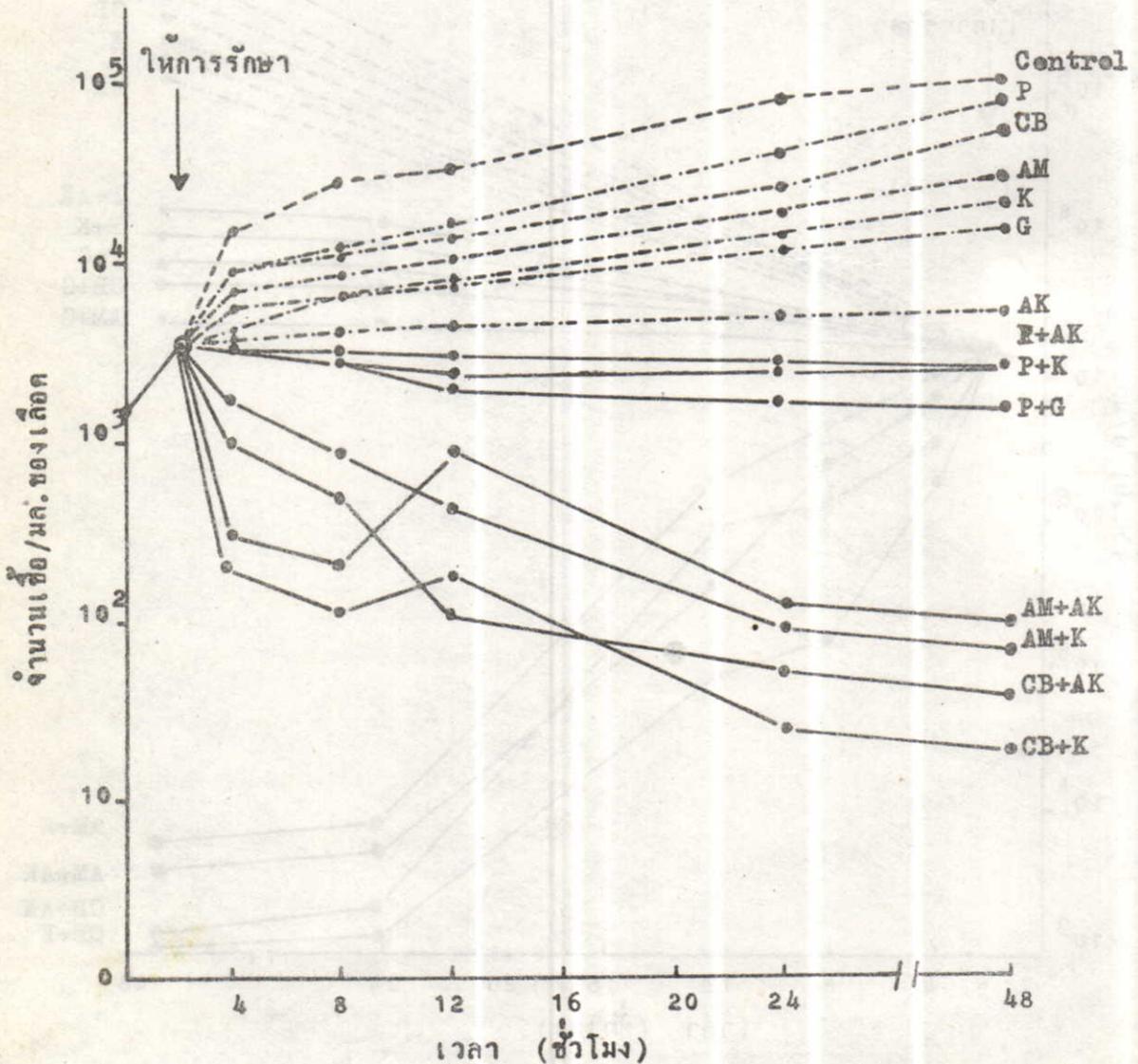


เวลา (ชั่วโมง)

รูปที่ 2 . แสดงจำนวนของเชื้อ Proteus mirabilis ที่แยกได้จากน้ำในช่องท้องหนู ที่เวลาต่าง ๆ กัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนู และอีก 2 ชั่วโมงต่อมา จึงรักษาหนูด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยว ๆ หรือผสมกัน และหนูกลุ่ม Control ได้รับความเปลี่ยนแปลง



รูปที่ 3. แสดงจำนวนของเชื้อ Proteus mirabilis ที่แยกได้จากเลือดในหัวใจหนู ที่เวลาต่าง ๆ กัน หลังจากที่ได้ฉีดเชื้อเข้าช่องท้องหนู และอีก 2 ชั่วโมงต่อมา จึงรักษาหนูด้วยยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยว ๆ , หรือผสมกัน ส่วนหนูกลุ่ม Control ได้รับน้ำเกลือแทน



บทวิจารณ์

การพิสูจน์ถึงประสิทธิภาพของยาด้านจุลชีพ โดยเฉพาะเพื่อหาการเสริมฤทธิ์กันของยาด้านจุลชีพ ๒ ชนิดในสิ่งมีชีวิต เช่น คนเรา เพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบันค่อนข้างเป็นไปได้ยาก เนื่องจากขาดบุคคลที่จะมาเป็นอาสาสมัครเพื่อการศึกษาทดลองต่างๆ เช่นการทำให้เกิด infection ด้วยเชื้อที่ศึกษาในคนและการรักษาต่อมาด้วยยาด้านจุลชีพเดี่ยวๆ หรือยาด้านจุลชีพ ๒ ชนิดผสมกัน เพื่อดูการเสริมฤทธิ์กัน หรือ อาจมีฤทธิ์อื่น ๆ ที่เกิดขึ้นได้ เช่น การต้านฤทธิ์กัน (Antagonism) ซึ่งเป็นการเสี่ยงมาก ฉะนั้นวิธีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่ง่ายที่สุด คือ ศึกษาในสัตว์ทดลอง เช่น ใช้หนูขาว เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้อธิบายถึงวิธีการทดลอง เพื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ Proteus ขึ้นในหนูขาวก่อน แล้วจึงหาคุณค่าในการรักษาต่อมาด้วยยาด้านจุลชีพพวก Penicillins และ Aminoglycosides ทั้งแบบเดี่ยวๆ และแบบที่นำมาผสมกัน โดยการหา Mortality rate หรือ Survival rat ของหนูที่รักษาด้วยยาด้านจุลชีพ ที่เวลาต่างๆ กัน หลังจาก challenge ด้วยเชื้อ Proteus แล้ว จากผลการศึกษาพบว่าการใช้ยาด้านจุลชีพ ๒

ชนิดผสมกันระหว่าง Penicillin และ Aminoglycoside เพื่อรักษา infection ด้วย Proteus ที่ทำให้เกิดในสัตว์ทดลองนั้น จะให้ผลได้ดีกว่าการรักษาด้วยยาด้านจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว โดยทำให้ Survival rate ของหนูที่รักษาด้วยยาด้านจุลชีพ ๒ ชนิด ร่วมกันนั้นสูงมากกว่าที่จะใช้ยาด้านจุลชีพเดี่ยว ๆ เพื่อรักษาตามลำพัง เพราะในขณะที่ยาด้านจุลชีพเดี่ยวๆ แต่ละชนิดใน dose ต่ำสุดที่ เลือกใช้รักษานั้น มีหนูเพียง ๑๐-๒๐% เท่านั้น ที่มีชีวิตรอด แต่ถ้าใช้ยาด้านจุลชีพ ๒ ชนิด ร่วมกันโดยใช้ dose ของยาแต่ละชนิดลดลงไปครึ่งหนึ่ง พบว่า Survival rate เพิ่มสูงขึ้น อย่างน้อยที่สุด ก็มีหนูถึง ๔๐% เหลือรอด และพบ Survival rate ได้สูงมากที่สุดถึง ๘๐-๑๐๐% โดยเฉพาะเมื่อใช้ยา Carbenicillin ร่วมกับ Kanamycin หรือ Amikacin ซึ่งจะเกิดการเสริมฤทธิ์กันอย่างเห็นได้ชัดในสิ่งมีชีวิตที่เกิดการติดเชื้อ Proteus อย่างรุนแรง โดยทำให้หนูมีชีวิตรอดหมดทุกตัว (๑๐๐%) หรือมีชีวิตรอดถึง ๘๐% เมื่อใช้ยา Ampicillin ร่วมกับ Kanamycin หรือ Amikacin จากการร่วมกันระหว่างยาด้านจุลชีพทั้ง ๔ คู่ ดังกล่าว คือ carbenicillin

+ Kannamycin, Carbenicillin + Amikacin, Ampicillin + Kanamycin, หรือ Ampicillin + Amikacin นี้เอง ยังช่วยขจัดเอาเชื้อ Proteus ออกจากบริเวณช่องท้องของหนูซึ่งเป็นบริเวณที่ infect เชื้อเข้าไป ภายในเวลา ๒๔-๔๘ ชั่วโมงได้ ทำให้หนูมี Survival rate ได้สูงมากที่สุด (๔๐-๑๐๐%) แม้จะ infect ด้วย Proteus จำนวนมากถึง ๗ เท่าของ LD50 ของ strain นี้ก็ตาม แต่ในทางตรงกันข้ามหนูที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ กลับพบจำนวนเชื้อ Proteus แบ่งตัวเพิ่มขึ้นมากมาย ตรงบริเวณที่ infect ด้วยเชื้อ และพบหนูตายหลังจาก ๔๘ ชั่วโมง

สำหรับยาต้านจุลชีพคู่อื่นอีก ๔ คู่ที่ศึกษา ให้ผลการเสริมฤทธิ์กันน้อยมาก มีหนูเพียง ๔๐-๖๐% ที่ยังคงมีชีวิตรอดอยู่เท่านั้น และไม่สามารถขจัดเชื้อออกจากบริเวณช่องท้องที่ infect เชื้อเข้าไปในหนูได้ จำนวนเชื้อที่พบที่นี้จึงใกล้เคียงกับจำนวนเชื้อที่รักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ นอกจากนี้ยังพบเชื้อ Proteus ได้จำนวนมากจากเลือดในหัวใจหนูหลังจากที่ infect ด้วยเชื้อแล้ว แสดงว่าเชื้อนี้ทำให้เกิด Bacteremia ซึ่งจากการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพเดี่ยวๆ ที่ใช้ Dose ขนาดต่ำสุดที่ไม่พอเพียงแก่การรักษาแล้ว จึงพบเชื้อได้จากเลือดในหัวใจหนู แต่จำนวนเชื้อที่พบ

น้อยกว่าจำนวนเชื้อที่พบน้อยกว่าจำนวนเชื้อจากบริเวณช่องท้องหนู และจากการใช้ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิด เพื่อรักษาหนูพร้อมๆ กันโดยเฉพาะกับยาต้านจุลชีพ ๔ คู่ดังกล่าวที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันโดยทำให้ Survival rate เพิ่มขึ้นสูงมากนั้น นอกจากจะทำให้เชื้อที่ตรวจจากบริเวณช่องท้องหนูลดจำนวนลงอย่างมากแล้ว ยังตรวจพบเชื้อจากหัวใจหนูลดน้อยลงไปด้วย มีจำนวนเชื้อไม่เกิน ๑๐๐ เซลล์/มล. เท่านั้นที่ตรวจพบได้

นอกจากได้ศึกษาในสัตว์ทดลองแล้ว ยังได้นำ Proteus strain นี้มาศึกษาโดยวิธีการในห้องปฏิบัติการด้วย และพบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยา Penicillin และ Aminoglycosides เช่นกัน โดยเฉพาะกับ ๔ คู่ดังกล่าว สำหรับวิธีการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดในสัตว์ทดลองนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ไม่สามารถทดสอบกับ Proteus ได้หลาย strains เพราะมีขีดจำกัดหลายประการ เช่น ต้องใช้หนูทดลองจำนวนมาก เพื่อศึกษากับยาต้านจุลชีพทั้งแบบเดี่ยวๆ ๒ ชนิด และแบบผสมกันถึง ๔ คู่ หรืออย่างน้อยต้องศึกษากับยาต้านจุลชีพถึง ๑๔ การทดลอง และยังคงทำ control โดยใช้น้ำเกลือแทนการใช้ยาต้านจุลชีพด้วย ซึ่งแต่ละการทดลองต้องใช้หนูขาวอย่างน้อย ๒๐ ตัว และเพื่อศึกษาหาจำนวนเชื้อจากบริเวณที่

infect ด้วยเชื้อ หรือเพื่อศึกษาหาจำนวนเชื้อที่ทำให้เกิด Bacteremia หลังจากให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ ๑ ชนิด, หรือ ๒ ชนิด, หรือไม่ให้การรักษาก็ตาม จะต้องทำการทดลอง โดยการให้หนูขาวจำนวนมากเช่นเดียวกัน ฉะนั้นการศึกษาดังนี้จึงใช้หนูจำนวนมาก อย่างน้อยถึง ๖๐๐ ตัว

ฉะนั้นในการศึกษาการใช้ยาร่วมกันระหว่าง Penicillin กับ Aminoglycosides เพื่อดูการเสริมฤทธิ์กัน หรือดู effects อื่นๆ นั้น จึงควรศึกษาโดยวิธีในห้องปฏิบัติการด้วย เพื่อเทียบผลการทดลองกับเชื้อ Proteus หลายๆ strains เพราะ effects ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ยาต้านจุลชีพ ๒ ชนิดร่วมกันนั้นอาจเปลี่ยนแปลงเป็นแบบใดก็ได้ ซึ่งนอกจากจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่นำมาใช้ร่วมกันแล้วยังขึ้นกับ species หรือ strains ของเชื้อที่นำมาทดสอบหรือขึ้นกับจำนวนเชื้อและสภาพแวดล้อมเพื่อทำให้เชื้อเจริญเติบโต และขึ้นกับ Degree ของการไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดที่ศึกษาด้วย ฉะนั้นจึงยากแก่การทำนายโดยอาศัยหลักทฤษฎีได้ว่าเมื่อใช้ยาร่วมกัน ๒ ชนิด effect ที่เกิดขึ้นควรเป็นอย่างไร และเพื่อหลีกเลี่ยงการต้านฤทธิ์กัน จึงต้องทำการทดสอบ

การร่วมกันของยาต้านจุลชีพก่อนที่จะให้การรักษาแก่ผู้ป่วย โดยพิจารณาวิธีการทดสอบที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งง่าย สดวก รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้ผลสัมพันธ์กับผลทางการรักษาอย่างแท้จริง ซึ่งควรศึกษาในผู้ป่วยที่เกิด infection ด้วยเชื้อ Proteus ด้วยเชื้อ Proteus ด้วย โดยประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแบบเดี่ยวๆ หรือแบบผสมกันนั้น หาได้จาก การ Assay หา serum level ในผู้ป่วยหลังจากให้การรักษาด้วยยาต้านจุลชีพแล้ว

สำหรับกลไกการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาพวก Penicillin และ Aminoglycoside ต่อเชื้อ Proteus species หรือเชื้อ Gram-negative enteric bacilli อื่นๆ ในสัตว์ทดลองหรือในห้องปฏิบัติการนั้น ยังไม่มีผู้ใดอธิบายได้อย่างชัดเจนนัก - จากการทดลองนี้บอกได้ว่ามีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างยาต้านจุลชีพทั้ง ๒ พวกขึ้น โดยเฉพาะพวก B-lactam antibiotics เช่น Ampicillin หรือ Carbenicillin กับพวก Aminoglycosides เช่น Kanamycin หรือ Amikacin ซึ่งเสริมฤทธิ์กันอย่างเห็นได้ชัดมากต่อเชื้อ Proteus mirabilis ที่ทำให้เกิด infection ในสัตว์ทดลอง โดยยาพวก B-lactam antibiotics สามารถระงับการสร้าง cell wall ของเชื้อแบคทีเรียได้ เพราะยาต้านจุล-

จุลชีพเหล่านี้ไม่มีผลขัดขวางต่อฤทธิ์ยาของ transpeptidase enzyme จึงทำให้การ Cross linkage ของ Mucopeptide chains เกิดขึ้นไม่ได้ เชื้อจึงไม่สามารถสร้าง cell wall ได้ เมื่อเชื้อขาด cell wall จึงทำให้การผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ของยา Aminoglycoside เป็นไปได้ง่ายยิ่งขึ้น โดยเฉพาะเชื้อที่ไวต่อยา Aminoglycosides จะถูกระงับการสร้างโปรตีนอันเป็นส่วนประกอบสำคัญภายในโปรโตพลาสซึมของเชื้อได้ เช่น Amikacin ซึ่งมีกลไกออกฤทธิ์เช่นเดียวกับ Kanamycin โดยไปจับกับ 30 S Subunit ของ Ribosome ของเชื้อ เกิด Misreading ของ mRNA ทำให้ Code ในการสร้างโปรตีนของเชื้อเปลี่ยนไปจากเดิม จึงมีผลทำให้ได้ Nonfunctional protein ซึ่งเมื่อเชื้อขาดโปรตีนที่สำคัญ จะทำให้เชื้อตายได้ ฉะนั้นยาทั้ง ๒ พวกจึงออกฤทธิ์เสริมกันเพื่อช่วยทำลายเชื้อให้ตายง่ายขึ้น

#### คำขอบคุณ

สำหรับการศึกษาคั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก China Medical Board, U.S.A. (CMB Grant No. 73-315) ซึ่งทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี.

#### เอกสารอ้างอิง

1. Kongfoo, U. A three-year study of susceptibilities of urinary pathogens to various antimicrobial drugs, Chiang Mai Med, Bull 18:75-84, 1979.
2. Snelling, C.F.T., Ronald, A.A., Cates, C.Y., and Forsyth, W.C., Resistance of gram-negative bacilli to gentamicin. J. Infect. Dis 124 (Supple.) : S264-S270, 1971.
3. Price, K.E., DeFuria, M.D., and Pursiano, T.A. Amikacin, an aminoglycoside with marked activity against antibiotic resistant clinical isolates. J. Infect. Dis. 134 (Suppl.): S249-S261, 1976.
4. Andriole, V.T. Antibiotic synergy in experimental infection with Pseudomonas, J. Infect, Dis 129:124-133, 1974.

5. Bulger, R.J., and Kirby, W.M.M. Gentamicin and ampicillin: Synergism with other antibiotics, Amer. J. Med. Sci. 246:717-726, 1963.
6. Durack, D.T., Pelletier. L.L., Peters dorf, R.G. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. II. Synergism between penicillin and streptomycin against penicillin-sensitive streptococci. J. Clin Invest. 53:829-833, 1974.
7. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496, 1966.
8. Hobby, G.L., and Dawson, M.H. The effect of sulfonamides on the action of penicillin. J. Bact. 51:447, 1946.

ABSTRACTANTIBIOTIC SYNERGY IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL  
PROTEUS MIRABILIS INFECTION

UNCHALEE KONGFOO B.Sc.(PHARM.), MS.(MICROBIOLOGY)\*

The in vivo synergistic effect of various combinations of antibiotics was tested in an experimental model of lethal infection with Proteus mirabilis. Two hours after intraperitoneal infection, mice were treated with penicillin, ampicillin, carbenicillin, gentamicin, kanamycin or amikacin singly or in various combinations of two of these drugs. Carbenicillin in combination with kanamycin or amikacin, and ampicillin in combination with kanamycin or amikacin significantly reduced mortality and cleared Proteus mirabilis from the blood stream and the challenge site. Survival rate of animals treated with penicillin plus either gentamicin or kanamycin or amikacin, and carbenicillin plus gentamicin, and ampicillin plus gentamicin was about 40-60 %. No antagonism was observed between these pairs of antibiotics. These studies indicate true in vivo synergy against this strain of P. mirabilis when carbenicillin or ampicillin is combined with kanamycin or amikacin as therapy for serious Proteus infections, and suggest that combined therapy with these pairs of antibiotics may be useful for certain Proteus infections in humans.

\* Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.