

ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของยา Ansamycin ในการยับยั้งการงอกของเชื้อวัณโรค*

ชัยเวช นุชประยูร**

**Nuchprayoon C. Minimal inhibitory concentration of Ansamycin for *M. tuberculosis*.
Chula Med J 1987 Oct; 31 (10) : 797-801**

*Various concentrations of Ansmycin, a rifamycin derivative, were tested on twenty-four strains of *M. Tuberculosis* to observe growth inhibition. Minimal inhibitory concentration (MIC) was found to be 0.2 mcg/ml (7H10 media). Another 49 strains on ogawa media were tested and the mic was found to be 2.0 mcg/ml. At low level of rifampin resistance (2.5 mcg/ml), no cross resistance to ansamycin (at MIC) was observed.*

Reprint requests : Nuchprayoon C, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.

Received for publication. July 9, 1987.

* งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการศึกษาการใช้ยา Ansamycin ในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคซึ่งเป็นโครงการร่วมระหว่างมหาวิทยาลัยมหิดล, สถาบันโรคทรวงอก สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยฯ และโรงพยาบาลโรคทรวงอก นนทบุรี กระทรวงสาธารณสุข

** ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ansamycin เป็น derivative ของ rifamycin-S ซึ่งค้นพบเมื่อเร็ว ๆ นี้ มีชื่อทางเคมีว่า Spiro-piperidyl rifamycin, LM 427 ยาดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคและได้รับความสนใจในการนำมาใช้รักษาโรคที่เกิดจาก *M. avium-intracellulare*⁽¹⁾

ยา Ansamycin ผ่านการวิจัยใน phase I และ II แล้ว และกำลังอยู่ในขั้นทำ clinical trial ในสถาบันหลายแห่ง และมีแนวโน้มว่าจะนำมาใช้รักษาวัณโรคมากขึ้นในอนาคต จึงเป็นการสมควรที่จะศึกษาเกี่ยวกับยาดังกล่าวทางห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นข้อมูลเกี่ยวกับการต้านยาของเชื้อวัณโรคในประเทศไทยทั้งในปัจจุบันและในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

เชื้อวัณโรคที่ใช้ในการศึกษานี้มี 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งแยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคของสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย ซึ่งยังไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน (wild strain) อีกกลุ่มหนึ่งเป็นเชื้อวัณโรคซึ่งปรากฏว่าต้านยา rifampin ในระดับความเข้มข้น 2.5 mcg/ml แล้ว ส่วนเชื้อวัณโรคมาตรฐาน (H37RV) ได้มาจาก Staten Serum Institut Denmark การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของยาต่อเชื้อวัณโรค การทำให้อาหารแข็งโดยผสมยาลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มี 2 ชนิด คืออาหารประเภทไข่และอาหารประเภทวุ้น อาหารประเภทไข่ใช้อาหารสูตร Ogawa ซึ่งเตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ⁽²⁾ ส่วนอาหารประเภทวุ้นที่ใช้คือ Middlebrook 7H10 ของบริษัท Difco และใช้ aged human plasma เป็น enrichment ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ยา ansamycin ได้มาจากบริษัท Farmitalia Carlo Erba Research Laboratories (Milan, Italy) ส่วนยา rifampin ที่ใช้ได้มาจากบริษัท Lederle Cyanamid International.

การเตรียมอาหารให้มีความเข้มข้นของยาระดับต่าง ๆ นั้นเริ่มจากการเตรียมน้ำยาเข้มข้นที่มีความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมยาลงในอาหารสูตร Ogawa ก่อนจะนำไปอบความร้อน ส่วนการผสมยาลงในอาหาร 7H10 นั้น ปฏิบัติดังนี้ : ต้มวุ้นตามส่วนผสม วุ้น 19 กรัม : น้ำ 1 ลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 55 องศาเซลเซียส จึงเติมพลาสมาและผสมยาลงไป การเติมพลาสมาใช้อัตราส่วนพลาสมา 1 มล. : วุ้น 1 ลิตร จากนั้นบรรจุลงขวด ๆ ละ 4 มล. แล้วปล่อยให้วุ้นแข็งตัว ความเข้มข้นของยา Ansamycin ในอาหาร (Ogawa และ 7H10) มีดังนี้

0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2 mcg/ml การเลือกระดับความเข้มข้นข้างต้นอาศัยข้อมูลจากเอกสารที่มีผู้ทำการศึกษาไว้เป็นแนวทาง

การดำเนินการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ตอน

ตอนที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการงอกของเชื้อวัณโรคของยา ansamycin ในอาหาร 7H10 วิธิตดสอบใช้เชื้อวัณโรคจำนวน 24 เชื้อสาย ใช้หัวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. ขูดโคโลนีมา 1 หัว ประมาณ 3-5 mg ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มม. ซึ่งมีลูกแก้ว 8-10 ลูก และน้ำกลั่น 3-4 หยด นำไปปั่นบน vortex mixture จนโคโลนีแตกกระจายดี เติมน้ำกลั่นที่ไร้เชื้อให้ suspension มีเชื้ออยู่ประมาณ 1 mg/ml หรือเทียบความขุ่นให้เท่ากับ MacFarland tube No 1 (Difco) แล้วทำ dilution 10^{-2} จาก stock suspension ตู๊ด 0.1 ml ของ suspension 10^{-2} หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของยาต่าง ๆ ซึ่งเตรียมไว้แล้ว รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา (control)

อบอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงอ่านผล ถ้ามีเชื้องอกเกิน 20 โคโลนีในขวดที่มีความเข้มข้นใด ถือว่า "มีการงอก" ของบักเตรีในความเข้มข้นนั้น

ตอนที่ 2 เปรียบเทียบฤทธิ์ของ ansamycin ต่อเชื้อวัณโรคที่ต้านยา rifampin และที่ไม่ต้านยา เพื่อดูว่าการต้านยาระหว่าง rifampin กับ ansamycin มีความเกี่ยวข้องกันหรือไม่ การศึกษาในตอนี้ กระทำในอาหาร 7H10 และใช้ระดับของ rifampin ที่ 2.5 mcg/ml เป็นระดับการต้านยา เชื้อวัณโรคที่นำมาศึกษามีจำนวน 24 เชื้อสายด้วยกัน เป็นเชื้อต้านยา rifampin 14 เชื้อสาย และไม่ต้านยา 10 เชื้อสาย ความเข้มข้นของ ansamycin ที่ใช้ทดสอบคือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mcg/ml

ตอนที่ 3 เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรคของ ansamycin ในอาหาร 2 ชนิด คืออาหารวุ้นซึ่งได้แก่ 7H10 และอาหารไข่ซึ่งได้แก่ Ogawa medium โดยใช้เชื้อวัณโรคจำนวน 49 เชื้อสายและใช้ระดับยา ansamycin ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0 mcg/ml การศึกษาตอนี้ก็เพื่อดูว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ ansamycin ในการยับยั้งการงอกของเชื้อวัณโรคในอาหาร 2 ชนิดจะมีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด เพื่อเป็นข้อมูลในการกำหนดระดับยาสำหรับการทดสอบการต้านยาโดยวิธี absolute concentration method ต่อไป

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาตอนที่ 1 (ตารางที่ 1) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการงอกของเชื้อวัณโรคในอาหาร 7H10 คือ 0.2 mcg/ml ซึ่งปรากฏว่ามีจำนวน 2 เชื้อสายที่งอกได้ในความเข้มข้นดังกล่าว แต่ก็มีเพียง 1-2 โคลนเท่านั้น ส่วนที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่านี้ ได้แก่ 0.1 และ 0.05 นั้น มีงอกร้อยละ 33.3 และ 45.8 ตามลำดับ และไม่ปรากฏว่ามีการงอกเกิดขึ้นเลยที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 mcg/ml ดังนั้นจึงอาจกำหนดค่า critical MIC สำหรับการทดสอบการต้านยาแบบวิธี absolute concentration ได้ที่ 0.5 และ 1.0 mcg/ml (ประมาณ 2-4 เท่าของ MIC)

ผลการศึกษาตอนที่ 2 (ตารางที่ 2) ปรากฏว่าทั้งเชื้อสายที่ต้านยา rifampin ในระดับความเข้มข้น 2.5 mcg/ml และที่ไม่ต้านยา rifampin ถูกยับยั้งโดย ansamycin ในอาหาร 7H10 ที่ระดับ 0.2 mcg/ml ทั้งหมด ซึ่ง

แสดงว่าการต้านยา rifampin ที่ระดับต่ำคือ 2.5 mcg/ml นั้น ไม่มี cross resistance กับ ansamycin

ผลการศึกษาตอนที่ 3 (ตารางที่ 3) ปรากฏว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการงอกของเชื้อซึ่งทำการทดสอบในอาหาร 7H10 ต่ำกว่าในอาหาร Ogawa ประมาณ 10 เท่า กล่าวคือในอาหาร 7H10 ค่า MIC = 0.2 mcg/ml (ตามผลการศึกษา ตอนที่ 1) แต่ในอาหาร Ogawa ค่า MIC = 2.0 mcg/ml ซึ่งใกล้เคียงกับปรากฏการณ์ที่พบใน rifampin

เมื่อวิเคราะห์ดูผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของ ansamycin ในอาหาร Ogawa จะพบว่าเมื่อความเข้มข้นของยาลดลง อัตราการงอกก็มีมากขึ้น (รูปที่ 1) กล่าวคือ ที่ความเข้มข้น 0.2 mcg/ml มีการงอกร้อยละ 96, ที่ความเข้มข้น 0.5 mcg/ml มีการงอกร้อยละ 53, ที่ความเข้มข้น 1.0 mcg/ml มีการงอกร้อยละ 29 และที่ความเข้มข้น 2.0 mcg/ml มีการงอกร้อยละ 2

TABLE 1 GROWTH INHIBITION OF M. TUBERCULOSIS IN DIFFERENT CONCENTRATION OF ANSAMYCIN IN MEDIA 7H10

Culture No.	Control	Growth of M. tuberculosis in different concentration of Ansamycin in media 7H10 (mcg/ml)					
		0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
4445	+	+	-	-	-	-	-
4045	+	-	-	-	-	-	-
2124	+	-	-	-	-	-	-
2039	+	+	+	-	-	-	-
1641	+	-	-	-	-	-	-
1670	+	+	-	-	-	-	-
1280	+	-	-	-	-	-	-
3792	+	+	+	-	-	-	-
3930	+	-	-	-	-	-	-
3483	+	+	+	-	-	-	-
3861	+	-	-	-	-	-	-
4068	+	+	+	*	-	-	-
4039	+	+	-	-	-	-	-
4150	+	+	+	-	-	-	-
4364	+	+	+	-	-	-	-
4010	+	+	+	*	-	-	-
3543	+	-	-	-	-	-	-
3909	+	+	-	-	-	-	-
4927	+	-	-	-	-	-	-
4940	+	-	-	-	-	-	-
3728	+	-	-	-	-	-	-
2735	+	-	+	-	-	-	-
5518	+	-	-	-	-	-	-
H37RV	+	-	-	-	-	-	-
	24 (100%)	11 (45.8%)	8 (33.3%)	0	0	0	0

N.B. + Growth (more than 20 colonies)

- No growth

* Some growth, but only 1 to 2 colonies

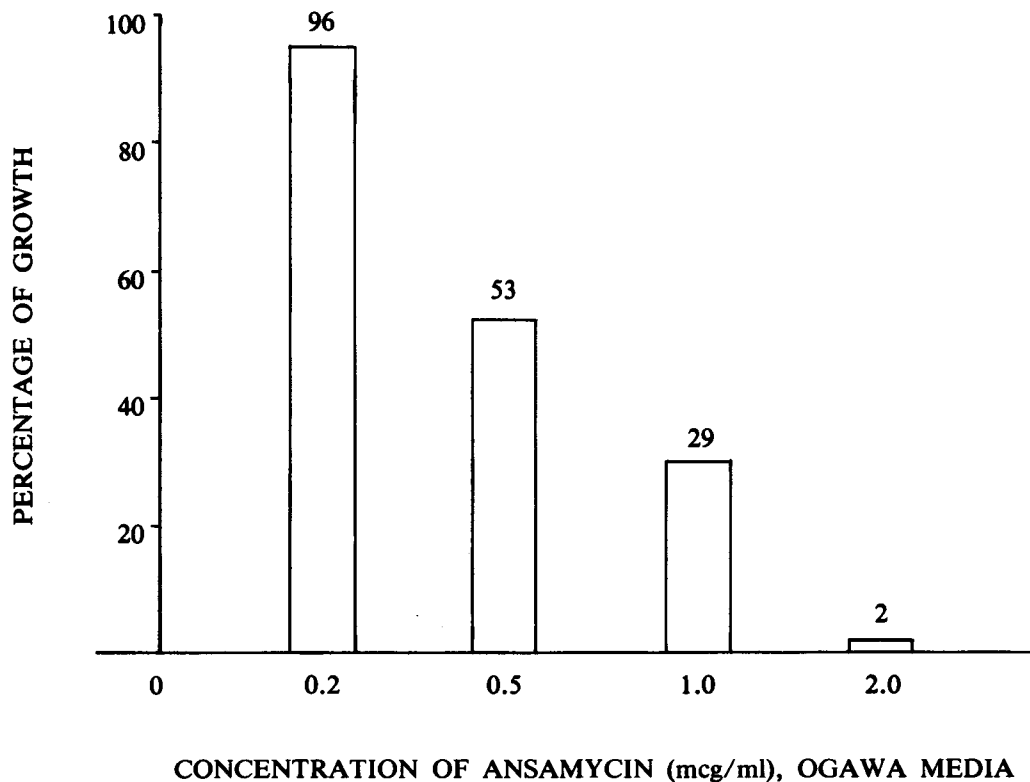
TABLE 2 THE COMPARISON OF GROWTH INHIBITION BETWEEN RIFAMPICIN SENSITIVE & RIFAMPICIN RESISTANT STRAINS OF M. TUBERCULOSIS ON DIFFERENT CONCENTRATION OF ANSAMYCIN IN MEDIA 7H10

STRAINS OF M. TUBERCULOSIS	NO. OF TESTS	NO. OF GROWTH ON MEDIA 7H10 WITH DIFFERENT CONCENTRATION OF ANSAMYCIN (mcg/ml)					
		0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
- RESIST TO RMP 2.5 mcg/ml	14	3	2	0	0	0	0
- SENSITIVE TO RMP	10	8	6	0	0	0	0
TOTAL	24	11	8	0	0	0	0

TABLE 3 THE COMPARISON OF GROWTH INHIBITION OF M. TUBERCULOSIS ON OGAWA MEDIA AND MEDIA 7H10 WITH ANSAMYCIN AT DIFFERENT CONCENTRATION

49 STRAINS OF M. TUBERCULOSIS TESTED	NO. OF GROWTH AT DIFFERENT CONCENTRATION OF ANSAMYCIN (mcg/ml)							
	0.2		0.5		1.0		2.0	
	No	%	No	%	No	%	No	%
Ogawa	47	96	26	53	14	29	1	2.0
7H10	0	0	0	0	0	0	0	0

FIGURE 1 PERCENTAGE OF M. TUBERCULOSIS GROWTH ON OGAWA MEDIA AT DIFFERENT CONCENTRATION OF ANSAMYCIN



วิจารณ์

Ansamycin (หรืออีกชื่อหนึ่งว่า Rifabutin, LM 427) เป็น derivative ของ rifamycin-S มีชื่อทางเคมีเต็มว่า 4-deoxy-3, 4-(2-spiro-(N-isobutyl-4piperidyl)-2, 5-dihydro-1,4-imidazo)-rifamycin-S เป็นผงสีแดงปนม่วง ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 847.12 ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม, methanol ละลายได้บ้างใน alcohol และละลายได้น้อยในน้ำ ยานี้มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ดีหลายตัว เป็นต้นว่า Staph aureus, E. coli, Neisseria และ Legionella ตลอดจนเชื้อวัณโรคและมัยโคแบคทีเรียอื่น โดยเฉพาะ M.avium-intracellulare กลไกการยับยั้งเชื้อต่าง ๆ เชื่อว่าเช่นเดียวกับ rifampin คือยับยั้งการทำงานของ DNA-dependent, RNA-polymerase และขัดขวาง Uridine uptake ของแบคทีเรีย⁽¹⁾

Ansamycin มี pharmacokinetic ที่แปลกไปจาก rifampin ก็คือมีระดับความเข้มข้นในเนื้อเยื่อของร่างกายสูงกว่าระดับความเข้มข้นในเลือด เมื่อรับประทาน ansamycin ขนาด 300 มก. จะได้ระดับยาในเลือดเพียง 0.49 mcg/ml ซึ่งต่ำกว่าระดับของ rifampin ในเลือดซึ่งกินในขนาดเท่ากันประมาณ 10 เท่า⁽¹⁾

ข้อเท็จจริงที่พบจากการศึกษาครั้งนี้คือ

1. ค่ายับยั้งการงอกต่ำสุด MIC ของ ansamycin ในอาหาร 7H10 คือ 0.2 mcg/ml
2. ค่ายับยั้งการงอกต่ำสุดของ ansamycin ในอาหาร Ogawa ซึ่งเป็นอาหารประเภทไข่คือ 2.0 mcg/ml ซึ่งสูงประมาณ 10 เท่าของค่า MIC ในอาหาร 7H10
3. เชื้อวัณโรคที่ต้านต่อ rifampin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (2.5 mcg/ml) นั้นไม่มี cross resistance กับ ansamycin

ในข้อแรกนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น เช่น รายงานของ Heifeit⁽²⁾ ก็ตรงกัน ดังนั้นในการกำหนดความเข้มข้นสำหรับทดสอบการต้านยาซึ่งเสนอไว้ที่ 0.5 mcg/ml สำหรับอาหาร 7H10 ซึ่งตรงกับที่ Heifeit เสนอไว้ น่าจะเป็นค่าที่เหมาะสม ส่วนในอาหาร Ogawa หรือ

Lowenstein-Jensen ซึ่งเป็นอาหารประเภทไข่ยังไม่มีผู้ใดรายงานค่า MIC ไว้ซึ่งจากผลการศึกษา ค่าระดับความเข้มข้นสำหรับตัดสินการต้านยาน่าจะเป็นที่ 4 mcg/ml

สาเหตุที่ค่า MIC ในอาหารประเภทไข่สูงกว่าอาหารประเภทอื่นถึง 10 เท่า ยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจน เข้าใจว่าโปรตีนจากไข่คงจะเป็นปัจจัยสำคัญเช่นเดียวกับยารักษาวัณโรคตัวอื่น ๆ ทำให้ potency ของยาลดลง

เป็นที่น่าสังเกตว่าการต้านยาข้ามพวก (cross resistance) ระหว่าง rifampin กับ ansamycin ไม่เกิดขึ้นที่การต้านยาระดับต่ำ แต่ก็มีรายงานว่า การต้านยาในระดับความเข้มข้นสูงจะมี cross resistance เห็นได้ชัดเจน กล่าวคือเชื้อวัณโรคซึ่งต้านยา rifampin ที่ระดับความเข้มข้น 5 mcg/ml จำนวน 105 เชื้อสาย และเชื้อต้านยาที่ระดับ 10 mcg/ml ในอาหาร 7H10 จำนวน 225 เชื้อสาย จะพบอัตรา Susceptible ต่อ ansamycin ที่ระดับ 0.5 mcg/ml ในอาหาร 7H10 ร้อยละ 46.7 และ 12.0 ตามลำดับ⁽³⁾ ซึ่งการศึกษาเพื่อยืนยันในเรื่องนี้ผู้รายงานจะได้กระทำในโอกาสต่อไป

สรุป

การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยา Ansamycin ในการยับยั้งการงอกของเชื้อวัณโรค ซึ่งทำการทดสอบในอาหาร 7H10 จำนวน 24 เชื้อสาย พบว่ามีค่า 0.2 mcg/ml และที่ทำการทดสอบในอาหาร Ogawa จำนวน 49 เชื้อสาย พบว่ามีค่า 2.0 mcg/ml เชื้อที่ต้านยาต่อ Rifampin ในระดับความเข้มข้น 2.5 mcg/ml (อาหาร 7H10) จำนวน 14 เชื้อสาย ปรากฏว่าจะถูกยับยั้งโดย ansamycin ในระดับความเข้มข้น 0.2 mcg/ml (อาหาร 7H10) ทั้งหมดซึ่งแสดงว่า การต้านยา- Rifampin ที่ความเข้มข้นต่ำ ไม่มี cross resistance กับ ansamycin.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้รายงานขอขอบคุณ แพทย์หญิงอารมณ์ บุญเกียรติกุล และ น.ส.ปราณี สุวานิช ที่ได้ให้ความช่วยเหลือให้การวิจัยนี้เป็นผลสำเร็จ

อ้างอิง

1. Fantfani A, Riva F, Sanfilippo A, Sardi A. LM 427, Rifabutin : Basic information. Familialia Carlo, Erba. 1985.
2. ชัยเวช นุชประยูร. เปรียบเทียบผลการใช้อาหารไข่สูตร Ogawa และสูตร Lowenstein-Jensen ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

วัณโรค. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2522 กรกฎาคม ; 23 (3) : 225-232

3. Heifets LB, Iseman ID. Determination of in vitro susceptibility of mycobacteria to ansamycin. Am Rev Respir Dis 1985 Sep; 132 (3) : 710-711