

RESEARCH ARTICLE

# Comparative Antibacterial Activity of Gentamicin and Polymyxin B Against Bacteria Isolated from Canine Otitis

Arinee Chatchawanchonteera<sup>1\*</sup>, Kamolchai Trongwanichnam<sup>2</sup>, Pantipa Boonkerd<sup>3</sup>, Sunanta Sukaphat<sup>3</sup>, Sirintra Pokapanich<sup>3</sup>

## Abstract

**Objective**—To study antibacterial activity of gentamicin and polymyxin B against bacteria isolated from otitis externa in dogs.

**Materials and methods**—Gentamicin and polymyxin B were diluted with 2 fold dilution and tested with 25 bacterial isolates from canine otitis externa such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* by microbiological method. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were also tested as standard controls.

**Results**—For *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* tested, gentamicin had minimal inhibitory concentration (MIC) values of 3.91, 1.95, 1.95, 0.98 and 0.78 µg/ml and minimal bactericidal concentration (MBC) values of 3.91, 1.95, 3.91, 3.91 and 0.78 µg/ml, respectively. Polymyxin B had MIC values of 3.91, 7.81, 10,000, 7.81 and 15.63 µg/ml and MBC values of 7.81, 7.81, 10,000, 15.63 and 31.25 µg/ml, respectively. Except for *Escherichia coli*, both MIC and MBC values of gentamicin were significantly lower than those of polymyxin B ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion**—Although gentamicin and polymyxin B could inhibit bacteria isolated from canine otitis such as *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, both MIC and MBC values of gentamicin were significantly lower than those of polymyxin B. Therefore, gentamicin would be a drug of choices for canine otitis externa, especially in case of *Proteus mirabilis*.

KKU Vet J. 2013;23(1):119-128.

<http://vmj.kku.ac.th/>

**Keywords:** Canine otitis; Gentamicin; Polymyxin B; Antibacterial activity

<sup>1</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, 10900

<sup>3</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002.

\*Corresponding author E-mail: arinee@kku.ac.th

## การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูอักเสบในสุนัข ของยาเจนตามัยซินและโพลีมิกซิน บี

อารินี ชัชวาลชลธีระ<sup>1\*</sup>, กมลชัย ตรงวานิชนาม<sup>2</sup>, พันทิพา บุญเกิด<sup>3</sup>,  
สุนันทา สุขพัฒน์<sup>3</sup>, ศิรินทรา โภคาพาณิชย์<sup>3</sup>

### บทคัดย่อ

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูอักเสบในสุนัขของยาเจนตามัยซินและโพลีมิกซิน บี

**วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ** เตรียมยาเจนตามัยซินและโพลีมิกซิน บี ความเข้มข้นลดลง 2 เท่า ตามลำดับ และทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่เก็บตัวอย่างจากสุนัขที่เป็นโรคหูอักเสบ จำนวน 25 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Microbiological method โดยมี *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมมาตรฐาน

**ผลการทดลอง** ยาเจนตามัยซินมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) เท่ากับ 3.91, 1.95, 1.95, 0.98 และ 0.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) เท่ากับ 3.91, 1.95, 3.91, 3.91 และ 0.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนยาโพลีมิกซิน บี มีค่า MIC เท่ากับ 3.91, 7.81, 10,000, 7.81 และ 15.63 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 7.81, 7.81, 10,000, 15.63 และ 31.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่า MIC และ MBC ของยาเจนตามัยซินต่างจากยาโพลีมิกซิน บี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ยกเว้น *Escherichia coli*

**ข้อสรุป** แม้ว่ายาเจนตามัยซินและยาโพลีมิกซิน บี สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูอักเสบในสุนัข ได้แก่ เชื้อ *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* แต่ยาเจนตามัยซิน มีค่า MIC และ MBC ต่ำกว่ายาโพลีมิกซิน บี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น ควรเลือกใช้ยาเจนตามัยซินมากกว่ายาโพลีมิกซิน บี โดยเฉพาะในกรณีเชื้อ *Proteus mirabilis*

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2556;23(1):119-128.

<http://vmj.kku.ac.th/>

**คำสำคัญ:** โรคหูอักเสบ เจนตามัยซิน โพลีมิกซิน บี ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

<sup>1</sup>ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

<sup>2</sup>ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

<sup>3</sup>คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ.ขอนแก่น 40002

\*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: arinee@kku.ac.th

## บทนำ

การเกิดช่องหูส่วนนอกอักเสบ (otitis externa) ในสุนัขเป็นกลุ่มความผิดปกติที่พบบ่อยที่สุด ซึ่งอาจพบได้ 10-20 % ในประชากรสุนัข [1] โดยมีอาการทางคลินิกคือ สุนัขสั่นหัวและเกาที่ใบหู [2] มีสิ่งคัดหลั่งออกจากหูและมีกลิ่นเหม็น สุนัขเจ็บปวดในช่องหูเนื่องจากอาการคันและการเกา ทำให้ช่องหูบวมอักเสบและส่งผลให้สุนัขมีพฤติกรรมที่เปลี่ยนไป โดยอาจมีอาการซึม หงุดหงิด ร้าย เมื่อสัมผัสบริเวณใบหู [3] การเกิดช่องหูอักเสบเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย การติดปรสิตภายนอก เชื้อรา สิ่งแปลกปลอม และการได้รับบาดเจ็บ แต่หนึ่งในสาเหตุที่สำคัญคือการติดเชื้อแบคทีเรีย [4-6] โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นสาเหตุของช่องหูอักเสบได้แก่ *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia* spp. และ *Proteus* spp. [7] นอกจากนี้ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของสุนัขเฉพาะพันธุ์ที่มีช่องหูลึก ใบหูยาว หรือได้รับการดูแลที่ไม่เหมาะสม ก็เป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน ในการรักษาภาวะช่องหูอักเสบอาจต้องอาศัยการดูแลและรักษาพร้อมกันหลายวิธี ได้แก่การให้ยาต้านการอักเสบแบบเฉพาะที่ [5, 8] ยาปฏิชีวนะเฉพาะที่ และการทำความสะอาดหู [9] ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจจะต้องทำการรักษาโดยการผ่าตัดร่วมด้วย

เจนตามัยซิน (gentamicin) เป็นตัวยาที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดในกลุ่มยาอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) [10] กลไกการออกฤทธิ์โดยการจับกับ 30s ไรโบโซม ทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่ผิดปกติ และส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียตาย ออกฤทธิ์ได้ดีต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แบบใช้ออกซิเจน รูปร่างเป็นแท่ง รวมถึงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกบางตัว และเชื้อแบคทีเรีย *Mycoplasma* spp. มักจะออกฤทธิ์ต่อเชื้อ Streptococci ได้ดีกว่ายา amikacin และออกฤทธิ์ได้น้อยกับเชื้อ Mycobacteria หรือ Nocardia อย่างไรก็ตาม เจนตามัยซินจะไม่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน หรือไม่สามารถออกออกฤทธิ์ได้ในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ซึ่งกลุ่มยาอะมิโนไกลโคไซด์นี้จะออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ขึ้นอยู่กับขนาดของยา และมักมีการใช้กันอย่างมากในโรงพยาบาลสัตว์เพื่อให้ตอบสนองต่อการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย [11, 12] ซึ่งตอบสนองได้ดี โดยเฉพาะกับกลุ่มเชื้อ Enterobacteriaceae และ *Pseudomonas aeruginosa* รวมทั้ง *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Haemophilus* spp. ในบรรดากลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก จะตอบสนองต่อ *S. aureus* แต่การตอบสนองต่อ Streptococci และเชื้ออื่นๆ ในกลุ่มแกรมบวก สามารถพบความแปรปรวนหรือไม่คงที่ได้ เจนตามัยซินเป็นยาที่มักถูกเลือกใช้เป็นอันดับแรกในการรักษาการติดเชื้อที่รุนแรง ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบแบบใช้ออกซิเจน มีการใช้รักษาแบบเฉพาะที่ในรายที่มีการติดเชื้อในบางตำแหน่ง เช่น โรคหูอักเสบ กระจกตาอักเสบ มดลูกอักเสบ เป็นต้น

โพลีมิกซิน บี (polymyxin B) เป็น amphipatic cycle decapeptide, cationic detergent และยาต้านแบคทีเรียแบบวงกว้าง มีผลในการต้านแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Enterobacter*, *Escherichia coli*,

*Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. และสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* spp. โพลีมิกซิน บี มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียตายอย่างรวดเร็ว โดยจะขึ้นอยู่กับกลไกในการออกฤทธิ์ของยา การทำให้แบคทีเรียตายจะเกิดขึ้นเมื่อยาตัวนี้ไปจับเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรีย ในบริเวณที่มี lipopolysaccharide อยู่อย่างซับซ้อนและเรียงตัวไม่เป็นระเบียบซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มชั้นนอกทั้งหมด เมื่อ polymyxin B เข้าไปใน cytoplasmic membrane ได้แล้ว จะทำให้เกิดการรั่วของส่วนประกอบใน cytoplasm ออกมาจากเซลล์ จากนั้นเซลล์แบคทีเรียจะมีการตายเกิดขึ้น [13-17] polymyxin B มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาการติดเชื้อภายนอกจากเชื้อ *Pseudomonas* เช่น กระจกตาอักเสบ หูชั้นนอกอักเสบ มีความเป็นพิษต่อไตสูง ไม่ถูกดูดซึมจากทางเดินอาหาร จึงมักใช้สำหรับภายนอกเท่านั้น

อย่างไรก็ดี ยาเจนตามัยซินและยาโพลีมิกซิน บี เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคหูอักเสบในสุนัข อีกทั้งยังปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียต่อยาปฏิชีวนะกรณีโรคหูอักเสบพบได้บ่อย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูอักเสบ ของยาเจนตามัยซิน และยาโพลีมิกซิน บี และหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ (minimal inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อจุลชีพ (minimal bactericidal concentration, MBC) ของยาทั้งสองต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหูอักเสบในสุนัข เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาและเลือกใช้ยาทางคลินิก รวมทั้งทราบถึงภาวะการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียต่อยาเจนตามัยซิน และยาโพลีมิกซิน บี

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### การเตรียมยาด้านจุลชีพ

ยาด้านจุลชีพที่ใช้ 2 ชนิด คือ polymyxin B sulfate (Sigma® SIGMA-ALDRICH, USA) gentamicin sulfate (Sigma® SIGMA-ALDRICH, USA) การเตรียมสารละลายยาที่ใช้ในการทดสอบ โดยการชั่งและละลายยา ให้ได้ความเข้มข้นของ gentamicin ตั้งแต่ 0.098 - 125 µg/ml และ polymyxin B ตั้งแต่ 0.98 - 500 µg/ml ส่วนเชื้อ *Proteus mirabilis* ใช้ความเข้มข้นของ polymyxin B ตั้งแต่ 39.06 - 20,000 µg/ml ในการทดสอบ

### การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เก็บตัวอย่างโดยการป้ายหรือ swab จากช่องหูสุนัขที่เกิดการอักเสบ จากนั้นทำการแยกชนิดของเชื้อ โดยวิธี microbiological methods โดยเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 5 ชนิด ชนิดละ 5 ไอโซเลต ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* และ *Staphylococcus aureus*

การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ โดยเจียโคโลนีของเชื้อที่ทำการทดสอบจากจานอาหาร

เลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Mueller-Hinton broth (Difco, Becton Dickinson, USA) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2-4 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเชื้อให้ได้ความขุ่นเทียบเท่าสารละลายมาตรฐาน 0.5 McFarland เจือจางด้วยน้ำเกลือในอัตราส่วน 1:100 จะได้สารละลายแบคทีเรียเข้มข้นประมาณ  $1 \times 10^6$  CFU/ml ควบคุมมาตรฐานการทดลองโดยใช้เชื้อมาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุม

#### **การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย**

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของยาโดยใช้วิธี microdilution broth method ตามมาตรฐานของ NCCLS [18] เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC, minimal inhibitory concentration) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (MBC, minimal bactericidal concentration)

วิธีการทดสอบ โดยเติม Mueller-Hinton broth ปริมาตร 50  $\mu$ l ลงในหลุมที่ 1-11 และปริมาตร 100  $\mu$ l ลงในหลุมที่ 12 ของไมโครเพลท จากนั้นดูดยาด้านจุลชีพ ปริมาตร 50  $\mu$ l ลงในหลุมที่ 1 คูณสารละลายที่ผสมกันดีแล้วจากหลุมที่ 1 ปริมาตร 50  $\mu$ l ลงในหลุมที่ 2 และทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ (two fold-dilution) จนถึงหลุมที่ 10 และดูดทิ้งไป 50  $\mu$ l คูณสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ปริมาตร 50  $\mu$ l ใส่ในหลุมที่ 1-11 โดยหลุมที่ 11 และ 12 จะเป็นหลุมที่ควบคุมผลบวกและผลลบ ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

#### **การอ่านผล**

สังเกตการเจริญของเชื้อจากความขุ่น โดยหลุมที่ใสจะไม่มี การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพที่ความเจือจางมากที่สุดที่ยับยั้งเชื้อจะถูกบันทึกเป็นค่า MIC จากนั้นนำหลุมที่ไม่ขุ่นมา 0.01 มิลลิลิตร (เริ่มจากหลุมที่บันทึก ค่า MIC) ทำการเพาะบน Standard plate count agar (Difco, Becton Dickinson, USA) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นของยาด้านจุลชีพจาก Standard plate count agar ที่ไม่มีแบคทีเรียเจริญเป็นค่า MBC ในการทดลองนี้จะทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วบันทึกผล

#### **การวิเคราะห์ทางสถิติ**

การทดลองนี้ศึกษาตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหูอักเสบในสุนัขจำนวน 5 ชนิด ชนิดละ 5 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 25 ไอโซเลต โดยมี *Staphylococcus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมมาตรฐาน และหาความแตกต่างของค่า MIC และ MBC ของยาเจนตามัยซินเปรียบเทียบกับยาโพลีมิกซิน บี โดยตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วย Kolmogorov-Smirnov Test และเลือกใช้สถิติแบบไม่อิงพารามิเตอร์ (Mann-Whitney Test สำหรับการเปรียบเทียบแบบ 2 กลุ่มหรือ Kruskal-Wallis Test สำหรับการเปรียบเทียบมากกว่า 2 กลุ่ม) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่  $P < 0.05$  และใช้โปรแกรม SPSS version 17 ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

## ผลการศึกษา

จากการทดลองเพื่อหาค่า MIC และค่า MBC ของยาเจนตามัยซิน และ โพลีมิกซิน บี ต่อเชื้อแบคทีเรีย 25 ตัวอย่าง พบว่าความเข้มข้นของยาเจนตามัยซินและโพลีมิกซิน บี ที่ระดับต่างๆ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดได้ที่ระดับแตกต่างกันดังแสดงใน **Table 1** และ **Table 2**

**Table 1.** MIC Values of Gentamicin and Polymyxin B Against Bacteria Isolated from Canine Otitis Externa

Bacteria	MIC values	
	Gentamicin ( $\mu\text{g/ml}$ ) (mean $\pm$ standard deviation)	Polymyxin B ( $\mu\text{g/ml}$ ) (mean $\pm$ standard deviation)
<i>Escherichia coli</i>	3.91 $\pm$ 3.43 <sup>Aa</sup>	3.91 $\pm$ 3.26 <sup>Ba</sup>
<i>Klebsiella</i> spp.	1.95 $\pm$ 0.99 <sup>Ab</sup>	7.81 $\pm$ 3.19 <sup>Ba</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	1.95 $\pm$ 44.53 <sup>Aab</sup>	10,000 $\pm$ 4,577.3 <sup>Bb</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.98 $\pm$ 0.40 <sup>Ac</sup>	7.81 $\pm$ 4.43 <sup>Ba</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.78 $\pm$ 12.38 <sup>Aabc</sup>	15.63 $\pm$ 13.91 <sup>Bc</sup>

<sup>A,B</sup> Within the same row, different capital letter superscripts indicate a significant difference.

<sup>a,b,c</sup> Within the same column, different lower-case letter superscript indicate a significant difference.

**Table 2.** MBC Values of Gentamicin and Polymyxin B Against Bacteria Isolated from Canine Otitis Externa

Bacteria	MBC values	
	Gentamicin ( $\mu\text{g/ml}$ ) (mean $\pm$ standard deviation)	Polymyxin B ( $\mu\text{g/ml}$ ) (mean $\pm$ standard deviation)
<i>Escherichia coli</i>	3.91 $\pm$ 32.26 <sup>Aa</sup>	7.81 $\pm$ 3.19 <sup>Aa</sup>
<i>Klebsiella</i> spp.	1.95 $\pm$ 1.18 <sup>Aa</sup>	7.81 $\pm$ 6.87 <sup>Ba</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	3.91 $\pm$ 5.03 <sup>Aa</sup>	10,000 $\pm$ 4,577.3 <sup>Bb</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.91 $\pm$ 2.01 <sup>Aa</sup>	15.63 $\pm$ 18.07 <sup>Bc</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.78 $\pm$ 15.82 <sup>Aa</sup>	31.25 $\pm$ 19.64 <sup>Bc</sup>

<sup>A,B</sup> Within the same row, different capital letter superscripts indicate a significant difference.

<sup>a,b,c,d</sup> Within the same column, different lower-case letter superscripts indicate a significant difference.

จากข้อมูลของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียต่อยาเจนตามัยซิน พบว่าค่า MIC แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มที่มีค่า MIC ต่ำ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีค่า MIC ปานกลาง ได้แก่ *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* และกลุ่มที่ 3 มีค่า MIC สูง

ได้แก่ *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* และ *Staphylococcus aureus* พบว่า *Proteus mirabilis* สามารถจัดอยู่ได้ทั้งกลุ่ม 2 และ 3 ส่วน *Staphylococcus aureus* สามารถอยู่ได้ทั้ง 3 กลุ่ม แต่กรณีค่า MBC แบ่งออกได้เป็นกลุ่มเดียวคือมีความต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

ผลข้อมูลของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียต่อยาโพลีมิกซิน บี พบว่า ค่า MIC แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กลุ่มที่ 1 ซึ่งมีค่า MIC ต่ำ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. และ *Pseudomonas aeruginosa* กลุ่มที่ 2 มีค่า MIC ปานกลาง ได้แก่ *Staphylococcus aureus* กลุ่มที่ 3 มีค่า MIC สูง ได้แก่ *Proteus mirabilis* และค่า MBC แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กลุ่มที่ 1 มีค่า MBC ต่ำ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Klebsiella* spp. กลุ่มที่ 2 ที่มีค่า MBC ปานกลาง ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* และกลุ่มที่ 3 มีค่า MBC สูง ได้แก่ *Proteus mirabilis*

ผลค่า MIC ของเชื้อ *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* จากการใช้ยาเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ พบว่ายาเจนตามัยซินสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่ายาโพลีมิกซิน บี โดยค่า MIC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

ผลค่า MBC ของเชื้อ *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* พบว่า ยาเจนตามัยซิน สามารถฆ่าเชื้อได้ดีกว่า ยาโพลีมิกซิน บี โดยค่า MBC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ส่วนเชื้อ *Escherichia coli* พบว่า ยาเจนตามัยซินมีค่า MBC ต่ำกว่ายาโพลีมิกซิน บี แต่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกต่อยาเจนตามัยซิน พบว่า ค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสูงกว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกแบบไม่มีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) และค่า MBC ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบสูงกว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกแบบมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ส่วนยาโพลีมิกซิน บี พบว่าค่า MIC และค่า MBC เชื้อแบคทีเรียแกรมลบสูงกว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกแบบไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

## วิจารณ์

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาเจนตามันซินและ โพลีมิกซิน บีเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคช่องหูส่วนนอกอีกเสบในสุนัข โดยพิจารณาค่า MIC และ MBC พบว่า ยาเจนตามัยซินมีประสิทธิภาพที่ดีกว่ายาโพลีมิกซิน บีทั้งต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อพิจารณาภายในกลุ่มเชื้อแกรมลบพบว่าค่า MIC ของเชื้อ *Proteus mirabilis* ต่อยาโพลีมิกซิน บี เป็นกลุ่มที่มีค่า MIC สูงมากแตกต่างจากเชื้ออื่นๆ

ในกลุ่มเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเชื้อ *Proteus mirabilis* มีความไวต่อยาโพลีมิกซิน บี น้อยกว่าเชื้อตัวอื่นๆ แต่เมื่อพิจารณาจากค่า MBC พบว่า เชื้อ *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ )

จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครุ่อกเสบในสุนัขพบว่าเชื้อแบคทีเรียบางตัว เช่น *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานค่อนข้างสูง ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากพัฒนาการของเชื้อบางไอโซเลตทำให้มีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้นมีผลให้แสดงค่า MBC สูงกว่าปกติ หรืออาจเกิดจากการเก็บตัวอย่างจากสุนัขบางตัวที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมาก่อน และบางตัวยังไม่ได้ได้รับการรักษา ทำให้การคือยาของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Zavascki และคณะ [19] ซึ่งพบว่าเชื้อ *Proteus mirabilis* มีอัตราคือยาสูงถึง 99.3 % ดังนั้น กรณีการคือเชื้อร่อกเสบเนื่องจาก *Proteus* spp. ซึ่งภาวะคือยาก่อนข้างสูง การรักษาโดยการใช้ยาเจนตามัยซินอาจมีประสิทธิภาพดีกว่าโพลีมิกซิน บี

โดยสรุปยาเจนตามัยซินและยาโพลีมิกซิน บี สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรครุ่อกเสบในสุนัขได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* โดยยาเจนตามัยซินมีค่า MIC ต่ำกว่าโพลีมิกซิน บี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) นอกจากยาเจนตามัยซินและโพลีมิกซิน บีแล้ว กรณีร่อกเสบจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้ยาปฏิชีวนะอื่นซึ่งให้ผลดี เช่น มาร์โบฟล็อกซาซิน นิโอมัยซิน หรือการใช้โพลีมิกซิน บี ร่วมกับนิโอมัยซิน [20, 21] รวมทั้งการใช้สมุนไพรไทย เช่น ต้นส่องฟ้าแดง ซึ่งให้ผลยับยั้งเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ทางคลินิกอาจต้องศึกษาการนำไปใช้ต่อไป [22] นอกจากนี้กรณีการใช้โพลีมิกซิน บี ร่วมกับนียาปฏิชีวนะอื่นเช่นเจนตามัยซิน rifampicin, imipenem, azithromycin จะให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียคือยา เช่น *K. Pneumonia*, *A. baumannii* เป็นต้น [19, 23, 24] อย่างไรก็ตาม การศึกษาความเป็นพิษของยาโพลีมิกซิน บี ต่อไตและระบบประสาทยังไม่ชัดเจน ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาทางเภสัชศาสตร์เพิ่มเติมในระดับต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีต้องขอขอบคุณ ผศ.ดร. พีระพล สุขอ้วน ที่กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ นางอรุณี บุตรตาสี ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวัสดุอุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ผศ.สรุสิทธิ์ อ้วนพรหมมา หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการทดลอง และขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนวิจัยส่วนหนึ่งในการทดลอง



## เอกสารอ้างอิง

1. Angus JC. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin Small Anim.* 2004;34:441-424.
2. Cole LK. Otoscopy evaluation of the ear canal. *Vet Clin Small Anim.* 2004;34:397-410.
3. Jacobson LS. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. *J S Afr Vet Assoc.* 2002;73:162-170.
4. Huang HP, Little CJ. Histological changes in the external ear canal of dog with otitis externa. *Vet Dermatol.* 2009;20:422-428.
5. Green CE. Otitis externa. In: Green CE, editor. *Infectious diseases of the dog and cat.* 3rd ed. Missouri: Saunders. 2006. p. 815-823.
6. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. *Muller & Kirk's small animal dermatology.* Philadelphia: Saunders. 2001.
7. Carter GR, Chengappa, MM. *A veterinarian's guide to laboratory diagnosis.* Ames, Iowa: Iowa State University Press. 1993.
8. Harvey RG, Harari J, Delauche AJ. *Ear diseases of the dog and cat.* London: Manson Publishing. 2001.
9. Dowling PM. Antimicrobial therapy of skin and ear infections. *Can vet J.* 1996;37:96-105.
10. Giguere S, Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, Dowling PM. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine.* 4th ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. 2007.
11. Peyrou M, Higgins R, Lavoie JP. Evolution of bacterial resistance to certain antibacterial agents in horses in veterinary hospital. *Can Vet J.* 2003;44:978-981.
12. Sanchez S, Stevenson MAM, Hudson CR, Maier M, Buffington T, Dam Q, et al. Characterization of multidrug resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dog. *J Clin Microbiol.* 2002;40:35-86.
13. Hancock REW. Alterations in outer membrane permeability. *Annu Rev Microbiol.* 1984;38:237-264.
14. Koike M, Iida K, Matsudo T. Electron microscopic studies on mode of action of polymyxin B. *J bacteriol.* 1968;97:448-452.
15. Newton BA. Reversal of the antibacterial activity of polymyxin B by divalent cations. *Nature.* 1953;172:160-161.
16. Newton BA. Site of action of Polymyxin B on *Pseudomonas aeruginosa* : antagonism by cations. *J Gen Microbiol.* 1954;10:491-499.
17. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 1985;49:1-32.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard-Fifth Edition. NCCLS document M1-A5 (ISBN 1-56238-394-9). NCCLS. Wayne. Pennsylvania. 2000.
19. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:1206-1215.
20. Chatchawanchontee A, Sricheun W, Jamikorn W, Srisanyong W, Trongwanishnam K, Thiratanaboon J, Udomkusonsri P. Efficacy of marbofloxacin against bacteria isolated from canine otitis externa. *KKU Vet*

*J.* 2010;20:71-78.

21. Chatchawanchonteera A, Trongwanichnam K, Arunorat J, Siriwalailak C, Rungsang T. Antimicrobial activity of neomycin against bacteria isolated from otitis externa in dogs. *KKU Vet J.* 2011;21:69-77.
22. Chatchawanchonteera A, Keeratikulapas P, Mungmai N, Chitsanoor S, Boottasri A, Kaenchumpa P, et al. Antimicrobial activity of *Clausena harmandiana* extract against bacteria isolated from dogs with otitis externa. *KKU Vet J.* 2009;19:48-55.
23. Dohar JE, Roland P, Wall GM, McLean C, Stroman DW. Differences in bacteriologic treatment failures in acute otitis externa between ciprofloxacin/dexamethasone and neomycin/polymyxin B/hydrocortisone: results of a combined analysis. *Curr Med Res Opin.* 2009;25:287-291.
24. Pietschmann S, Hoffmann K and Voget M. Synergistic effects of micronazole and polymyxin B on microbial pathogens. *Vet Res Commun.* 2009;33:489-505.