

การประเมินผลในห้องปฏิบัติการและทางคลินิกของยาเซฟไตรแอกซอนที่มีต่อโรคซิเจลโลซิส



นางสาววงแห ทงษ์วิศิษฏกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๖

(ISBN 974-562-729-1)

013140

i 171 6994x

LABORATORY AND CLINICAL EVALUATION
OF CEFTRIAXONE TO SHIGELLOSIS

MISS WONGCARE HONGVISITGUL

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1983

(ISBN 974-562-729-1)

Thesis Title Laboratory and clinical evaluation of ceftriaxone
 to shigellosis

By Miss Wongcare Hongvisitgul

Department Microbiology

Thesis Advisor Professor Somsak Lolekha, M.D., Ph.D.
 Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

..... *S. Bunnag* Dean of Graduate School
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

..... *Saree Virunhaphol* Chairman
(Assistant Professor Saree Virunhaphol, M.Sc. in Pharm.)

..... *Somsak Lolekha* Member
(Professor Somsak Lolekha, M.D., Ph.D.)

..... *Santi Thoongsuwan* Member
(Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

..... *Aurapin Rudeechu* Member
(Assistant Professor Aurapin Rudeechu M.Sc. in Pharm.)



หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินผลในห้องปฏิบัติการและทางคลินิกของยาเซฟไตรแอกโซนที่มีต่อโรคซิเจลโลสิส
ชื่อผู้ผลิต	นางสาววรางค์ หงษ์วิชิตธุฎ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมศักดิ์ โล่ห์เสนา. MD., Ph.D. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สันติ อังสุวรรณ, Ph.D.
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	๒๕๒๖

บทคัดย่อ

ในการตรวจสอบผลในห้องปฏิบัติการของเซฟไตรแอกโซนที่มีต่อเชื้อซิเจลโล สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน ๑๐๓ สายพันธุ์ โดยประกอบด้วยเชื้อซิเจลโลในกลุ่ม A, B, C, D เป็นจำนวนร้อยละ ๓, ๖๐, ๑๑ และ ๒๗ ตามลำดับ พบว่า ยามีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อดีมาก จากการทดลองโดยวิธี agar dilution method พบว่า ร้อยละ ๕๐ และ ๕๐ ของเชื้อที่ทดสอบถูกยับยั้งได้ในความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ ๐.๐๐๕๖๕ และ ๐.๐๒๖๒ ไมโครกรัม ต่อ มิลลิกรัม ตามลำดับ และในการทดสอบหาความไวรับ (antimicrobial susceptibility test) ของเชื้อที่มีต่อดิสก์ของยา เซฟไตรแอกโซนที่มีปริมาณ ๓๐ ไมโครกรัม ต่อ ๑ ดิสก์ โดยวิธี disc diffusion method พบว่า เชื้อทั้งหมด ๓๐ สายพันธุ์ที่ทดสอบมีความไวรับต่อยาโดยมีขนาดของอินฮิบิชันโซนโดยเฉลี่ยเป็น 30.7 ± 3.36 มม. (อยู่ในช่วง ๑๗.๖ - ๔๐.๐ มม.) ในการศึกษาผลทางคลินิกของยาเซฟไตรแอกโซนในเด็กอายุระหว่าง ๑ เดือน ถึง ๑๒ ขวบ ทั้งเพศหญิงและชายที่ป่วยเป็นโรคบิดแบซิลลารี จำนวน ๒๑ คน โดยให้ยาครั้งเดียวทางเส้นเลือดดำในขนาด ๔๐ มิลลิกรัม ต่อ น้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม พบว่า เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคส่วนใหญ่คือ S. flexneri (กลุ่ม B) และ S. sonnei (กลุ่ม D) ซึ่งพบเป็นอัตราร้อยละ ๖๒ และ ๒๔ ตามลำดับ จาก

การศึกษาพบว่า คนไข้ส่วนใหญ่มีอาการทางคลินิกกลับเป็นปกติภายใน ๔ วันของการรักษา ได้แก่ อาการไข้ ซึ่งพบว่าคนไข้จำนวน ๑๑ ใน ๑๓ ราย (ร้อยละ ๘๔) มีอุณหภูมิของร่างกายกลับเป็นปกติ ในระยะเวลาเฉลี่ย ๑.๐๘ วัน (๑-๒ วัน) ในขณะที่พบว่าคนไข้จำนวน ๑๑ ใน ๑๔ ราย (ร้อยละ ๗๘) มีจำนวนครั้งของการถ่ายอุจจาระลดลงเหลือ ≤ ๓ ครั้งต่อวันในระยะเวลาเฉลี่ย ๓.๑ ± ๑.๔๖ วัน (๑-๕ วัน) ลักษณะของอุจจาระของคนไข้จำนวน ๑๒ ใน ๑๔ คน (ร้อยละ ๘๖) กลับเป็นปกติโดยถ่ายเป็นเนื้ออุจจาระในระยะเวลาเฉลี่ย ๓.๗๔ ± ๑.๐๑ วัน (๒-๕ วัน) แต่จากการศึกษาทางจุลชีววิทยา ได้ตรวจพบเชื้อในอุจจาระในวันที่ ๕ ของการรักษาเป็นจำนวน ๑๑ ใน ๑๓ ราย (ร้อยละ ๘๔) ส่วนการตรวจวิเคราะห์ระดับของยาในซีรัม ด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยาหลังจากการให้ยาเซฟไตรแอกโซนตามวิธีการดังกล่าว เป็นเวลา ๑, ๒, ๕, ๘, ๒๔ และ ๔๘ ชั่วโมง พบว่า มีค่าระดับของยาเฉลี่ยเท่ากับ ๒๒๑ ± ๓๘ , ๑๕๖ ± ๒๐.๓ , ๑๑๘ ± ๑๔ , ๔๕ ± ๑๔ , ๔ ± ๔ และ ๑.๗ ± ๐.๐๔ ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่าในเวลา ๔๘ ชั่วโมงหลังจากรับยาระดับของยาในซีรัมจะมีเป็นอย่างน้อย ๔๐ เท่าตัวของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งเชื้อซีเจลลาได้ร้อยละ ๙๐ (ค่า MIC₉₀) การใช้เซฟไตรแอกโซนทำให้อาการไข้ยหายไประยะเร็วและอาการอื่น ๆ ทางคลินิกของคนไข้ส่วนใหญ่ได้กลับเป็นปกติในระยะเวลาอันสั้น แต่ไม่ได้ผลในการกำจัดเชื้อจากอุจจาระของผู้ป่วย

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis title Laboratory and clinical evaluation of ceftriaxone
to shigellosis

Name Miss Wongcare Hongyisitgul

Thesis advisor Professor Somsak Lolekha, M.D., Ph.D.
Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

Department Microbiology

Academic Year 1983



ABSTRACT

The in vitro study of ceftriaxone was done on 103 strains of Shigella species (3 % of gr A, 60 % of gr B, 11 % of gr C and 27 % of gr D) obtained from every part of Thailand. The compound showed a very good activity against the test organisms. In the determination of minimal inhibitory concentration (MIC) which was done by agar dilution method, the MIC₅₀ and MIC₉₀ obtained were 0.00465 and 0.0262 ug/ml respectively. In the disc diffusion test for ceftriaxone susceptibility of 30 strains of the organisms, it was found that all of the organisms (100 %) were susceptible and gave the average zone diameter of 30.7 ± 3.76 mm (ranges from 17.6 - 40 mm) to the 30 µg ceftriaxone disc. In clinical studies, ceftriaxone was given intravenously as a single dose of 50 mg/kg body weight to 21 children aged from 1 month to 12 years in both sexes whom were suffered from shigellosis. The most common causative organisms were S. flexneri (gr B, 62 %) and S. sonnei (gr D 24 %). Most of the patients were clinically cured within 5 days after treatment. Eleven out of thirteen cases (85 %) gave a good temperature response and became afebrile within a

mean of 1.08 days (1-2 days), while the reduction of bowel movements to ≤ 3 times per day occurred in 11 of 19 patients (58 %) within an average of 3.1 ± 1.56 days (1-5 days) after ceftriaxone injection. The stool characteristics of 12 in 19 (63 %) patients became normal with the well-formed stool after an average of 3.75 ± 1.01 days (2-5 days) of treatment. In determination of bacterial stool cultures in these patients, it was found that 11 out of 13 cases (85 %) had bacterial persistence in stools on the fifth day of treatment. The average sera levels assayed microbiologically at 1,2,5,8,24 and 48 hours after injection were 221 ± 39 , 156 ± 2.3 , 118 ± 19 , 94 ± 19 , 8 ± 4 and 1.7 ± 0.04 $\mu\text{g/ml}$ respectively. This suggested that at the 48th hour after injection, ceftriaxone's concentration was still at least 50 times over the MIC_{90} to Shigella species. So, in shigellosis, ceftriaxone was effective clinically, especially, the very good fever response was achieved but the patients were not bacteriologically cured.

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ACKNOWLEDGMENTS

I wish to express my grateful thanks to Professor Dr. Somsak Lolekha, head of Division of infectious diseases and immunology, Department of Paediatrics, Ramathibodi Hospital, my thesis advisor for his most valuable supervision. Apart from this I also appreciate his warm and sincere personal concern throughout the period of this research work.

My grateful thanks are also due to Assistant Professor Dr. Santi Thoongsuwan, my thesis co-advisor and the head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Dr. Prakorb Boonthai the former Medical Superintendent and Dr. Santisuk Vibulbundhitkij, the head of Department of Pathology, Bamrasnaradura Infectious Hospital for facilities and providing me the opportunities and means carry out this study program in both places.

The clinical study would never have succeeded without great help from Dr. Pavit Poonyarit, Department of Paediatrics to whom I am very grateful for his kindness and cooperation. I want to express my sincere thanks to Miss Somsri Warnkitcharoen, Mr. Wichai Ngarmsook, especially Mr. Boonchuay Eampokalap, Mrs. Sirirat Likanontsakul and all of the staffs in the Clinical Microbiology Laboratory and the Department of Paediatrics for their very helpful cooperation in many laboratory and clinical works,

My sincere thanks are also due to Miss Suwanna Boonrumrukthaporn and staffs of the microbiological laboratory of Research Center,

Ramathibodi Hospital for their cooperation .

I wish to express my gratitude to The National Research Council of Thailand, for granting my partial financial support to conduct this study.

I would like to express my thanks to Mr. Panop Songdej, The Product Manager of the Pharmaceutical Division, The Roche Thailand limited for providing much useful information and for his cooperation.

My grateful thanks are also due to Mr. and Mrs. Bill Mary, and Dr. Ursula Loewenthal for their kindness and help in language correction.

Finally, I wish to express my thanks to all of those whose names have not been mentioned and to those who in one way or another helped to make this work a reality.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table of contents

page

Thai Abstract.....	iv
English Abstract.....	vi
Acknowledgements.....	viii
Contents.....	x
List of Abbreviations.....	xvi
List of Tables.....	xviii
List of Figures.....	xxi
Chapter 1 Introduction.....	1
- Background and rational.....	1
- Objective.....	7
- Materials and Methods.....	7
- Significance of the study.....	9
Chapter 2 Review of Literature.....	11
Part A Ceftriaxone	
History.....	11
Chemistry.....	12
Structure activity relationship.....	13
Composition and stability.....	14
Antibacterial properties of ceftriaxone.....	15
The microorganisms which are moderately.....	23
sensitive and resistant to ceftriaxone.....	23
Effects of ceftriaxone on <u>Shigella</u>	24

Mechanism of action.....	28
Synergism and antagonism.....	28
Stability to β -lactamases.....	29
Antibiotic sensitivity testing.....	29
Clinical efficacy.....	32
Tolerance.....	38
Summary of clinical efficacy and tolerance.....	39
Clinical Pharmacology.....	40
- plasma concentration.....	40
- protein binding.....	40
- distribution in the body.....	40
- metabolism.....	40
- elimination.....	41
- total clearance.....	41
- elimination in renal or hepatic insufficiency.....	42
Part B Shigellosis.....	44
Definition.....	44
History.....	44
Bacteriology.....	45
Cultures of <u>Shigella</u>	45
Toxin production.....	47
- the exotoxin	
- the endotoxin	
pathogenicity and pathogenesis.....	48

Clinical manifestation.....	49
- Incubation period	
- Symptoms	
Treatment of Shigellosis.....	50
a correction of dehydration	
b specific treatments	
Chapter 3 Materials and Methods.....	53
Part A Laboratory Evaluations of ceftriaxone to	
<u>Shigella species</u>	53
1. Antimicrobial Susceptibility Test.....	53
1.1 Medium and preparation of plates	
1.2 Discs	
1.3 Preparation of the Inoculum	
1.4 Interpretation of the test results	
2. Determination of Minimal Inhibitory	
Concentration (MIC).....	56
2.1 The test medium	
2.2 The antibiotic diluent	
2.3 Preparation of the antimicrobial	
dilutions	
2.4 Preparation of test plates	
2.5 Preparation of the inoculum	
2.6 Inoculations of agar plates	
2.7 Reading of test results	

Part B	Clinical Evaluations of ceftriaxone to	
	Shigellosis.....	59
1.	Drug used.....	59
1.1	Method of reconstitution and route of administration	
1.1.1	For intravenous injection	
1.1.2	For intramuscular injection	
1.2	Dose of ceftriaxone	
2.	Criteria for selecting patients.....	59
2.1	Age and disease	
2.2	Condition for other drugs taken	
2.3	Number	
2.4	Place and duration of study	
3.	Other treatments.....	60
4.	Determination of serum levels of.....	61
	Ceftriaxone after single dose injection	
4.1	The assay medium	
4.2	The assay microorganism	
4.3	Preparation of plates	
4.4	Preparation of the standard	
4.4.1	Preparation of the diluting solution	
4.4.2	Dilution of the standard	
4.5	Preparation of the sample	

4.6	Assay procedure	
4.6.1	Preparation of the standard plates	
4.6.2	Standard curve determination	
4.6.3	Preparation of the sample plates	
4.6.4	Calculations of the sera concentrations of Ceftriaxone	
5.	Method of clinical evaluation.....	66
5.1	The fever response	
5.2	The stool characteristics	
5.3	The frequency of defecations	
5.4	Other gastro-intestinal tract symptoms	
5.5	Dehydration	
6.	Determination of presence of shigella.....	67
	in rectal swabs after ceftriaxone administration	
Chapter 4	Results.....	69
Part A	Results of Laboratory Evaluations of Ceftriaxone to <u>Shigella species</u>	69
1.	Results of Antimicrobial Susceptibility Tests.....	69
1.1	Sensitivity to Ceftriaxone	

1.2	Sensitivity to other antimicrobial agents	
2.	Results of determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC).....	70
	- The MIC 50 and MIC 90.....	84
	- The details of organism with higher MIC of ceftriaxone.....	85
Part B	Results of Clinical Evaluations of.....	85
	ceftriaxone to Shigellosis.....	85
1.	The clinical response of patients.....	85
	treated with ceftriaxone	
1.1	Age and sex distribution of patients.....	88
1.2	Causative organisms.....	88
1.3	Fever response.....	89
1.4	The change in frequency and characteristics of stools.....	89
1.5	Response of other symptoms.....	91
2.	The bacteriological response in patients.....	91
3.	The sera levels of ceftriaxone.....	93
Chapter 5	Discussion.....	98
Chapter 6	Summary and Conclusion.....	105
References.....		108
Vita.....		116



LIST OF ABBREVIATIONS

$^{\circ}\text{C}$	=	degree celsius
conc^{n}	=	concentration
cont.	=	continue
Cl^{-}	=	chloride ion
fig	=	figure
gm	=	gram
μg	=	microgram
HCO_3^{-}	=	bicarbonate ion
hr	=	hour
IM.	=	intramuscular
IV., iv.	=	intravenous
K^{+}	=	potassium ion
kg	=	kilogram
L	=	litre
μl	=	micro litre
MIC	=	minimal inhibitory concentration
mg	=	milligram
ml	=	milli litre
mm	=	milli metre
n, No.	=	number
Na^{+}	=	sodium ion
NSS	=	normal saline solution
org^{m}	=	organism
p.	=	page
s.c., sub.cut.	=	subcutaneous

TMP/SMX = Trimethoprim/Sulfamethoxazole
WHO = World Health Organization
wt. = weight
yrs. = years



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of tables

page

table 1.	Reports of antimicrobial susceptibility of <u>Shigella</u> showing the percentage of sensitive strains obtained from Ramathibodi Hospital in 1973-1982.....	2
2.	Reports of antimicrobial susceptibility of <u>Shigella</u> showing the percentage of sensitive strains obtained from Siriraj Hospital in 1978-1980.....	3
3.	Classification of cephalosporins.....	6
4.	Susceptibility of different clinical isolates of Ceftriaxone....	17
5.	Susceptibility of 39 gentamicin resistant strains to different antimicrobials,.....	18
6.	In vitro activity of RO 13-9904 and other β -lactam antibiotics (MIC μ g/ml) from Angehrn/Probst.....	19
7.	The effect of increasing the inoculum size on the minimum inhibitory concentration.(mg/litre).....	20
8.	Protective activity of RO 13-9904 and other β -lactam antibiotics against systemic infections of the mouse. (ED ₅₀ , mg/Kg subcut. x 2).....	21
9.	Protective activity against pseudomonal septicemia of the mouse.(ED ₅₀ , mg/Kg s.c. x 3).....	22
10.	Pathogens which are moderately sensitive to ceftriaxone.....	23
11.	Microorganisms resistant to ceftriaxone.....	23
12.	MICs of antibiotics tested against various Gram negative.....	25

bacilli; Shelton et al, Dallas, Texas, USA

13.	MICs for 90 % of Strains (Shelton et al).....	26
14.	The susceptibility of <u>Shigella</u> and some other Gram negative bacilli to ceftriaxone as reported by Angehrn et al.....	27
15.	The susceptibility of bacteria to ceftriaxone, reported by Lolekha, S. et al, Ramathibodi Hospital, Thailand.....	28
15/2	Distribution of ceftriaxone trial centers.....	32
16.	Patients treated with ceftriaxone, grouped according to indications (compiled from 81 publications and presentations).....	34
17.	Success rate (very good and good results) of ceftriaxone therapy in the main indications.....	35
18.	Summarized clinical results with ceftriaxone compared with reference antibiotics, as presented in individual papers...	36
19.	The different groups and types of shigellae.....	45
20.	Zone-size interpretative chart.....	55
21.	The results of antimicrobial susceptibility test of shigellae to ceftriaxone and other antimicrobial agents.....	71
22.	The antimicrobial susceptibility test of shigellae isolated from studied patients to antimicrobial agents.....	75
23.	The summary of drug resistance pattern of 74 shigellae isolates.....	76
24.	The drug resistance pattern of 15 strains of shigellae isolated from the studied patients.....	77
25.	The MIC of ceftriaxone to shigellae.....	78
26.	The summarized data of the MIC of shigellae of each group to ceftriaxone (agar dilution technique).....	82

27. The summarized number of shigellae isolates which have the same MIC of ceftriaxone.....	83
28. The clinical results of patients treated with ceftriaxone...	86
29. Age and sex distribution of patients.....	88
30. Fever response.....	89
31. Frequency and characteristics of stools.....	90
32. Other symptoms and their disappearance after treatment.....	91
33. Bacteriological results of patients' stool culture.....	92
34. Bacteriologic response.....	93
35. The serum ceftriaxone concentration in children.....	95
36. The summarized data of patients treated with ceftriaxone in determination of sera levels.....	96
37. The oral dose distribution of furazolidone in 4 patients....	96
38. Test of furazolidone activity against <u>S. lutea</u>	96
39. Comparison of the antibiotic susceptibility test's results of this study to the Ramathibodi Hospital's test results in the same year (1982).....	98
40. The comparison of the MIC ₅₀ , MIC ₉₀ and modal MIC of ceftriaxone to shigellae of various experiments.....	99
41. The comparison of clinical results of ampicillin therapy and ceftriaxone therapy in shigellosis.....	101

Lists of Figures

page

Figure 1.	Basic cephem nucleus with R at positions in which major modifications are possible. Arrow indicates sites of beta-lactamase attack	4
2.	Structure of Ceftriaxone Sodium (RO 13-9904).....	13
3.	The newer cephalosporins with a methyl-tetrazol thiol side chains.....	14
4.	Regression curve for ceftriaxone (30 µg/disc) on DST agar..	31
5.	Analysis of the main indications and numbers of patients treated with ceftriaxone (n = 2,832).....	33
6.	Shows that (Rocephin) has the lowest total clearance of all cephalosporins; this explains its long plasma half-life.....	42
7.	The concentration and time relationship of ceftriaxone in sera of patients	97
8.	The activities of ceftriaxone against 103 strains of <u>Shigella spp.</u>	84
9.	Comparative third generation cephalosporins' activities versus <u>Shigella spp.</u> (40 strains).....	24
10.	Sera ceftriaxone concentrations after a 50 mg/kg IV. dose in children.....	104
11.	Plasma concentrations after IV. injection of 1 gm ceftriaxone in 5 healthy volunteers.....	104
12.	Plasma concentrations of ceftriaxone after a 50 mg per kg IV dose in children (Schaad et al).....	105