

SHORT COMMUNICATION

**Keberkesanan Antibiotik Titisan Mata Gentamicin Terhadap Sista
Acanthamoeba spp. Isolat Klinikal**

The Effectiveness of Gentamicin Eye Drops on Clinical Isolates of Acanthamoeba spp.

Mohamed Kamel Abd Ghani^{1*}, Noramalina¹, Anisah Nordin², Yusof Suboh², Noraina Abd Rahim², Norazah Ahmad³

¹Fakulti Sains Kesihatan, Universiti Kebangsaan Malaysia, 50300 Jalan Raja Muda Abdul Aziz, Kuala Lumpur, Malaysia

²Jabatan Parasitologi dan Entomologi Perubatan, Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia

³Institut Penyelidikan Perubatan, 50588 Jalan Pahang, Kuala Lumpur, Malaysia

*Corresponding author: profkamel@ukm.edu.my, mohamedkamela@yahoo.com

Received: 6 November 2018; Accepted: 8 December 2018; Published: 15 December 2018

Abstract

Acanthamoeba spp. boleh menyebabkan keratitis kepada manusia, khususnya kepada pemakai kanta sentuh yang tidak menitikberatkan aspek higen kanta sentuh. Kajian ini bertujuan untuk mengkaji keberkesanan antibiotik titisan mata Gentamicin terhadap sista *Acanthamoeba* isolat klinikal iaitu HKL 5, HKL 11, HKL 32, dan HKL 51. Kajian dimulakan dengan melakukan suspensi sista terhadap keempat-empat isolat klinikal tersebut. Mikropencapaian terhadap antimikrob dilakukan dan kemudiannya suspensi sista ditambah, seterusnya dieramkan selama 24 jam pada 30°C sebelum dipindahkan ke atas plat agar bukan nutrien (NNA) yang dilapisi *E. coli* matian haba. Plat agar diperhatikan setiap hari sehingga hari yang ke-14 untuk mengesan sebarang kehadiran trofozoit di bawah mikroskop *inverted*. Kehadiran trofozoit *Acanthamoeba* menunjukkan bahawa antibiotik ujian tidak berkesan terhadap sista *Acanthamoeba*. Gentamicin berkesan terhadap sista *Acanthamoeba*, dengan nilai purata sistisidal minimum (MCC) 1453.1 µg/ml. Gentamicin merupakan antibiotik yang boleh digunakan dalam rawatan keratitis *Acanthamoeba* memandangkan kepada keberkesanannya terhadap sista *Acanthamoeba* isolat klinikal dalam kajian ini.

Kata kunci: Antibiotik titisan mata, Gentamicin, *Acanthamoeba*, Malaysia

Abstrak

Acanthamoeba spp. may cause keratitis in humans especially amongst the contact lens wearers who do not practice good hygienic care of contact lenses. This study aims to evaluate the effectiveness of Gentamicin on four clinical isolates of *Acanthamoeba* cysts from Kuala Lumpur Hospital consisting HKL 5, HKL 11, HKL 32, and HKL 51. Cysts suspensions of all 4 clinical isolates of *Acanthamoeba* were prepared. Microdilution of antimicrobial was prepared and cyst suspension was added and later incubated at 30°C for 24 hours before being transferred onto non-nutrient agar (NNA) plates seeded with heat-killed *E. coli*. The plates were observed daily until day 14 to detect the presence of trophozoites under inverted microscope. The presence of trophozoite stage indicates ineffectiveness of the tested antibiotic towards *Acanthamoeba* cysts. Gentamicin was found to be effective against *Acanthamoeba* cysts with MCC mean value of 1453.1 µg/ml. Gentamicin could be used for the treatment of *Acanthamoeba* keratitis as it exhibited cysticidal effect on all isolates of *Acanthamoeba* cysts in this study.

Keywords: Topical antibiotic eyedrop, Gentamicin, *Acanthamoeba*, Malaysia

PENGENALAN

Acanthamoeba adalah patogen oportunistik yang boleh menyebabkan penyakit keratitis *Acanthamoeba* (AK), Ensefalitis Amebik bergranuloma (GAE) serta lesi kutaneus pada manusia (Visvesvara et al., 2007; Khan 2006). Keratitis *Acanthamoeba* (AK) biasanya adalah berkaitan dengan penggunaan kanta sentuh (Gagnon & Walter, 2006) yang menjadi faktor risiko paling penting terhadap berlakunya penyakit ini.

Pemakaian kanta sentuh kini semakin popular di seluruh dunia (Hay et al., 1994), yang bertujuan untuk menambahbaik penglihatan dan juga untuk kepentingan kosmetik. Menurut Anne (2001), 5% daripada populasi rakyat Malaysia gemar memakai kanta sentuh. Peningkatan penggunaan kanta sentuh juga dilihat selari dengan peningkatan prevalens keratitis *Acanthamoeba*

Pesakit yang mengalami penyakit keratitis ini akan mengalami tanda-tanda awal seperti kemerahan pada mata, pengurangan lapisan epithelia dan mengalami fotofobia, edema, sakit akibat neuritis radial, kehilangan lapisan epithelia dan pembentukan nanah pada stroma mata serta kesan-kesan pengurangan dalam penglihatan (Radford et al., 2002, Moreire & Prajna, 2003). Ciri klinikal yang utama dalam pencirian *Acanthamoeba* keratitis ini adalah dengan kehadiran infiltrasi stroma berbentuk cecincin, iaitu hasil daripada sel-sel inflamasi infiltrasi (Roongruangchai et al., 2008). Penyakit ini jika tidak dirawat segera, boleh menyebabkan kebutaan.

Acanthamoeba spp. wujud dalam dua bentuk iaitu samada sebagai trofozoit yang aktif atau sista yang dorman (Schuster, 2002). Apabila keadaan persekitaran berubah dan keadaan itu tidak sesuai untuk trofozoit hidup, trofozoit itu akan mengalami ensistasi dan membentuk sista yang tidak aktif (Clarke & Neiderkorn, 2006).

Di Malaysia, sejak kes pertama dilaporkan pada tahun 1995 (Kamel & Norazah, 1995), bilangan kes keratitis *Acanthamoeba* terus meningkat sejajar dengan peningkatan penggunaan kanta sentuh (Kamel et al., 2005). Oleh yang demikian, kami menjalankan kajian untuk menguji keberkesanan antibiotik titisan mata yang ada di pasaran terhadap isolat *Acanthamoeba* tempatan.

BAHAN DAN KAEDAH

Isolat yang digunakan dalam kajian ini adalah terdiri daripada isolat klinikal daripada Hospital Kuala Lumpur (HKL) iaitu HKL 5, HKL 11, HKL 32, dan HKL 51. Antibiotik titisan mata yang digunakan ialah Gentamicin. Kaedah penentuan nilai sistisidal minimum (MCC) ini adalah berdasarkan kaedah Narasimhan dan rakan-rakan (2002).

Suspensi sista *Acanthamoeba* (10^5 cyst/ml) divorteks selama 1 minit sebelum digunakan supaya sista bertaburan sama rata dalam larutan salin Page. Sebanyak 10 μ l suspensi sista dipipet masuk ke dalam telaga mikrotiter yang telah mengandungi 100 μ l antibiotik. Sista akan dimasukkan ke dalam semua telaga kecuali telaga untuk kawalan negatif. Terdapat dua kawalan positif dan dua kawalan negatif. Kawalan positif yang pertama adalah terdiri daripada larutan Page's Amoebic Saline (PAS) dan sista, manakala yang kedua adalah terdiri daripada sista dan larutan 3% hidrogen peroksida (H_2O_2). Kawalan negatif pertama hanya mengandungi larutan PAS dan kawalan negatif kedua pula hanya mengandungi larutan agen antimikrob. Campuran akan dibiarkan selama 24 jam (Kilvington et al., 2002).

Selepas 24 jam eramannya di dalam inkubator bersuhu 30°C, campuran di setiap telaga akan dipipet masuk ke dalam vial 1.5 ml yang berlainan. Telaga mikrotiter

kemudiannya akan dibilas dengan 100 µl larutan salin Page untuk memastikan tiada sista yang tertinggal dalam telaga mikrotiter dan juga bertujuan menyingkirkan agen antimikrob yang terdapat di sekeliling sista. Cucian itu dilakukan sebanyak tiga kali. Campuran kemudian diemparkan pada halaju 740 xg selama 5 minit untuk mendapatkan mendapan sista. Supernatan di bahagian atas vial akan dibuang dan mendapan dibawahnya akan dipindahkan terus ke atas agar bukan nutrien (NNA) yang telah dititiskan dengan suspensi *E. coli* matian haba pada hari sebelumnya. Selepas itu, semua piring petri ditutup dan dieramkan pada suhu 30°C selama 48 jam. Agar diperhatikan setiap hari selama 14 hari dibawah mikroskop *inverted* untuk mengesan kehadiran sista dan trofozoit *Acanthamoeba*. Jika tiada pertumbuhan trofozoit *Acanthamoeba* berlaku dalam masa 14 hari, maka agen antibiotik yang digunakan adalah berkesan dalam membunuh sista *Acanthamoeba*.

Apabila kajian keberkesanan antibiotik terhadap sista *Acanthamoeba* dibuktikan dapat membunuh sista *Acanthamoeba*, kajian kepekatan sistisidal minimum (MCC) dilakukan terhadap antibiotik tersebut dengan kaedah yang sama tetapi dengan kepekatan yang berbeza dengan kajian keberkesanan secara dupikat.

DAPATAN

Agar bukan nutrien (NNA) yang mengandungi sista *Acanthamoeba* dan *E. coli* matian haba dieram dan diperhatikan di bawah mikroskop *inverted* selama 14 hari untuk menentukan keberkesanan agen antimikrob terhadap sista tersebut. Setelah diuji didapati Gentamicin berkesan membunuh sista pada kepekatan 3000 µg/ml seperti ditunjuk pada Jadual 1. Nilai kepekatan sistisidal minimum (MCC) ditentukan pada kepekatan terakhir antibiotik yang tidak menunjukkan pertumbuhan trofozoit. Dalam kajian ini, nilai MCC Gentamicin boleh ditentukan kerana ia menunjukkan keberkesanannya pada kepekatan awal iaitu 3000 µg/ml.

Jadual 2 menunjukkan nilai MCC bagi Gentamicin terhadap sista *Acanthamoeba* isolat klinikal dengan nilai puratanya adalah 1453.1 µg/ml.

Jadual 1. Keberkesanan Gentamicin terhadap sista *Acanthamoeba* spp. isolat klinikal

Isolat	Gentamicin (3000 µg/ml)
HKL 5	√
HKL 11	√
HKL 32	√
HKL 51	√

Petunjuk: √ Berkesan (Trofozoit tidak hadir)

Jadual 2. Nilai MCC bagi Gentamicin

Isolat	Nilai MCC
HKL 5	562.5
HKL 11	2250.0
HKL 32	2250.0
HKL 51	750.0
Nilai MCC Purata	1453.1

PERBINCANGAN

Antibiotik titisan mata Gentamicin sangat mudah diperolehi daripada kebanyakan kedai farmasi di Malaysia, dan biasa digunakan untuk merawat jangkitan mata. Hasil kajian menunjukkan bahawa antibiotik titisan mata Gentamicin adalah berkesan terhadap sista *Acanthamoeba* isolat klinikal. Walaupun Gentamicin adalah antibiotik dan bukannya antiprotozoa, kesan tindakannya yang tidak berbalik itu memberikan kesan sistisidal kepada sista. Walaupun Gentamicin berkesan terhadap sista *Acanthamoeba*, nilai MCC nya adalah agak tinggi iaitu 1453.1 µg/ml. Gentamicin juga telah digunakan dalam rawatan keratitis *Acanthamoeba* tetapi sebagai antimikrob sampingan dengan kombinasi dengan antimikrob lain seperti PHMB dan juga Chlorhexidine. Hasil kajian ini turut disokong oleh kajian terdahulu Noradilah et al. 2009 dan 2012. Bagaimanapun kajian terdahulu kami menunjukkan Gentamicin tidak berkesan terhadap sista *Acanthamoeba* (Mohamed Kamel et al., 2011). Ini berkemungkinan disebabkan oleh penggunaan isolat atau strain yang berbeza-beza kerentanannya.

Gentamicin 3 mg/mL mengandungi 3 mg gentamicin sulfat dan 4.4 µg/mL benzalkonium klorida sebagai pengawet. Ia tergolong dalam kumpulan aminoglikosida dan kegunaan biasanya adalah sebagai agen anti bakteria berspektrum lebar. Ia biasa digunakan dalam kes jangkitan mata oleh bakteria gram negatif, khasnya jangkitan *Pseudomonas aeruginosa*. Cara tindakannya adalah secara pengikatan tidak berbalik dengan ribosom RNA16S dan membekukan inisiasi kompleks (30S-mRNA-tRNA) maka dengan itu tiada inisiasi berlaku. Ia juga memperlahankan sintesis protein yang telah diinisiasi dan mengaruh bacaan yang salah terhadap mRNA. Mohamed Kamel et al. 2000 melaporkan bahawa seorang pesakit keratitis *Acanthamoeba* dan *Pseudomonas aeruginosa* di Malaysia telah berjaya dirawat dengan kombinasi 0.02 % chlorhexidine, 0.1 % propamidine isethionate (Brolene) dan gentamicin 1.5 %. Kajian terbaru Mohamed Kamel et al. 2018 juga turut menunjukkan Gentamicin mempunyai kesan sistisidal terhadap isolat klinikal *Acanthamoeba* walaupun nilai MCC puratanya agak tinggi iaitu 1875ug/ml. Kanta sentuh adalah peralatan yang agak sesuai membenarkan pertumbuhan biofilem pada permukaannya, yang terdiri daripada pelbagai mikrob termasuklah bakteria seperti *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilem ini pula akan menghalang pertumbuhan dan perlekatan *Acanthamoeba* kepada kanta sentuh dan dengan ini meningkatkan risiko kejadian keratitis *Acanthamoeba*. Hasil kajian ini menunjukkan Gentamicin boleh digunakan bersama agen anti *Acanthamoeba* yang lain bagi rawatan keratitis *Acanthamoeba*.

KESIMPULAN

Gentamicin telah menunjukkan keberkesanannya terhadap sista *Acanthamoeba* isolat klinikal dengan nilai purata sistisidal MCC nya pada 1453.1 µg/ml. Ia berpotensi digunakan dalam rawatan keratitis *Acanthamoeba* dengan kombinasi antimikrob yang lain.

RUJUKAN

- Anne, C.K.T. (2001). Visual benefits with contact lenses. *Medical Journal of Malaysia supplement*, 56, 37.
- Clarke, D.W., Alizadeh, H. & Niederkorn, J.Y. (2006). Intracorneal instillation of latex beads induces macrophage-dependent protection against *Acanthamoeba* keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 4917-4925.

- Gagnon, M. R. & Walter, K. A. (2006). A case of *Acanthamoeba* keratitis as a result of a cosmetic contact lens. *Eye and Contact Lens*, 32(1), 37-38.
- Hay, J., Kirkness, C. M., Seal, D. V., Wright, P. 1994. Drug resistance and *Acanthamoeba* keratitis: the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy. *Eye*, 8, 555– 563.
- Kamel, A.G.M, & Norazah, A. 1995. First case of *Acanthamoeba* keratitis in Malaysia. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89, 652.
- Kamel A.G.M, Haniza, H. Anisah, N. Yusof, S. Faridah, H. Norhayati, M. et al. (2005). More *Acanthamoeba* keratitis cases in Malaysia. *International Medical Journal*, 12(1), 7-9.
- Khan, N. A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 30, 564–595.
- Kilvington, S., Hughes, R., Byas, J. & Dart, J. 2002. Activities of therapeutic agents and *myristamidopropyl dimethylamine* against *Acanthamoeba* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 2007-2009.
- Mohamed Kamel, A.G., Faridah Hanum, Norazah, A., Noor Rain A, Hay, J, & Seal, D. (2000). A case of waterborne contact lens associated *Acanthamoeba* keratitis from Malaysia: Successful treatment with Chlorhexidine and Propamidine. *International Medical Journal*, 7, 63-65.
- Mohamed Kamel Abd Ghani, Hany Sady SR, Anisah Nordin, Yusof Suboh, Noraina Ab Rahim & Norazah Ahmad. (2018). Antimicrobial Efficacy Against *Acanthamoeba* Isolates From Clinical Cases. *International Medical Journal*, 25(2), 112-115.
- Mohamed Kamel Abd. Ghani, Shirley Tang Gee Hoon, Anisah Nordin, Putri Noradyani Megat Hashim, Yusof Suboh & Noraina Abdul Rahim (2011). In Vitro Susceptibility Test for *Acanthamoeba* Species Isolated From Clinical Specimens against Chlorhexidine, Propamidine Isethionate, Gentamicin and Chloramphenicol. *International Medical Journal*, 18(2), 146-148.
- Moreire, A. T. & Prajna, N. V. (2003). *Acanthamoeba* as a cause of peripheral ulcerative keratitis. *Cornea*, 22(6), 576-577.
- Narasimhan, Sandhya, M. S., Madhavan, Hajib, N. M. D. & Therese, K. L. (2002). Development and application of an in vitro susceptibility test for *Acanthamoeba* species isolated from keratitis to *polyhexamethylene biguanide* and *chlorhexidine*. *Journal of Cornea and External Disease*, 21(2), 203-205.
- Noradilah S.A., Mohamed Kamel A. G., Anisah N., Yusof S. & Noraina A. R. (2009). Keberkesanan antibiotik titisan mata Neomycin, Gentamycin dan Ciprofloxacin terhadap sista *Acanthamoeba* spp. *Malaysian Journal of Health Sciences*, 7(2), 39-46
- Noradilah SA, Mohamed Kamel AG, Anisah N, Noraina AR & Yusof S. (2012). The effectiveness of Gentamicin against *Acanthamoeba* cysts in-vitro. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 8(2), 51–54.
- Radford, C. F., Minassian, D. C. & Dart, J. K. (2002). *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: Incidence, outcome and risk factors. *British Journal of Ophthalmology*, 21(7), 536-542.
- Roongruangchai, K., Roongruangchai, J., Kaewmanee, S. & Manoot, D. (2008). Comparing lethal dose of povidone-iodine and Virkon® to the *Acanthamoeba* cyst in vitro study. *Siriraj Medical Journal*, 60(4), 187-189.
- Schuster, F.L. (2002). The interaction of *Acanthamoeba* cysts with macrophages and neutrophils. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 342-354.
- Visvesvara, G.S., Moura, H., & Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Federation of European Materials Societies of Immunology and Medical Microbiology*, 50, 1–26.