

ผลของความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับยังการเจริญ ของยาแอมปีซิลลิน และเจนตัมัยซินที่มีต่อเชื้อ
สแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส และ ซูโคโมแนส แอรูจิโนซ่า



นางสาวนงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา เภสัชศาสตร มหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2523

001087

I1584949X

Effects of Subinhibitory Concentrations of Ampicillin and
Gentamicin on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Miss Nongluksna Sriubolmas

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

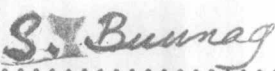
Graduate School

Chulalongkorn University


1980


Thesis Title Effects of Subinhibitory Concentrations of
 Ampicillin and Gentamicin on *Staphylococcus aureus*
 and *Pseudomonas aeruginosa*
By Miss Nongluksna Sriubolmas
Department Microbiology
Thesis Advisor Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

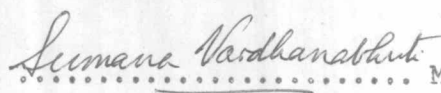
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University
in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

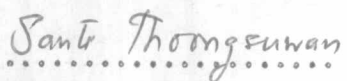

..... Dean of Graduate School
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee


..... Chairman
(Assistant Professor Pisawat Dutiyabodhi)


..... Member
(Professor M.L. Pranod Xumsaeng)


..... Member
(Assistant Professor Sumana Vardhanabhuti)


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

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับยับยั้งการเจริญ ของยาแอมปีซิลลิน และเจนต้ามัยซินที่มีต่อ เชื้อสแตฟิโลคอคคัส ออเรียส และ ซูโด-โมแนส แอรจินโนซ่า
ชื่อนิสิต	นางสาวนงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ อึ้งสุวรรณ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2523



บทคัดย่อ

ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะในขนาดต่ำกว่าระดับยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เชื้อมีรูปร่างผิดปกติได้ในหลอดทดลอง ซึ่งคล้ายกับรูปร่างของเชื้อที่พบใน specimen และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยซึ่งได้รับการรักษาด้วยยาฆ่าเชื้อ ในการศึกษานี้ได้หาความเข้มข้นต่ำสุดของแอมปีซิลลิน และเจนต้ามัยซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสแตฟิโลคอคคัส ออเรียส และ ซูโดโมแนส แอรจินโนซ่า โดยวิธี broth dilution เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ใน tryptic soy broth (TSB) ที่มีแอมปีซิลลิน หรือเจนต้ามัยซินในความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และในขนาด $\frac{1}{2}$ และ $\frac{1}{4}$ ของความเข้มข้นต่ำสุดนั้นเป็นเวลาานาน 4 16 และ 24 ชั่วโมง ตรวจหาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดโดยการนับจำนวน colonies ต่อมิลลิลิตรที่ขึ้นบน tryptic soy agar ผลที่แสดงให้เห็นจากแผนภูมิการเจริญของเชื้อที่ได้ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของยาที่ต่ำกว่าระดับยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วยช่วงเวลาของการเจริญซึ่งยาวนานกว่าปกติ เมื่อนำเชื่อนี้มาตรวจโดย Gram staining และด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ปรากฏว่าจาก Gram staining smears มีเซลล์ขนาดใหญ่ของเชื้อสแตฟิโลคอคคัสที่ถูกอิทธิพลของแอมปีซิลลิน diplococcal forms ของเชื้อสแตฟิโลคอคคัสที่ถูกอิทธิพลของเจนต้ามัยซิน ลักษณะเป็นเส้นใย และ granular forms ของเชื้อซูโดโมแนส แอรจินโนซ่าที่ถูกอิทธิพลของแอมปีซิลลิน และ bipolar staining ในเชื้อซูโดโมแนส แอรจินโนซ่าที่ถูกอิทธิพลของเจนต้ามัยซิน ภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบความผิดปกติของผนังกันในเซลล์ของเชื้อ

สแตฟฟิโลคอคคัสที่ถูกอิทธิพลของแอมพิซิลลิน เซลล์ค่อนข้างกลม และมีผนังชนิดโค้งออก 2 ด้าน ในเชื้อสแตฟฟิโลคอคคัสที่ถูกอิทธิพลของเจนต้ามัยซิน เซลล์ตัวยาวลักษณะเป็นเส้นใยที่ไม่มีผนัง และมีวัตถุที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นกระจายอยู่ทั่วภายในเซลล์ของเชื้อซูโดโมนาส แอรจิโนซ่าที่ถูกอิทธิพลของแอมพิซิลลิน และการเพิ่มจำนวน vacuoles และการเปลี่ยนแปลงในการกระจายของ ribosomes ภายในเซลล์ของเชื้อซูโดโมนาส แอรจิโนซ่า ที่ถูกอิทธิพลของเจนต้ามัยซิน รูปร่างที่ผิดปกติไปเช่นนี้ บางโอกาสทำให้เข้าใจผิดว่าเป็น species ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจแสดงถึงการมียาปฏิชีวนะอยู่ในความเข้มข้นต่ำกว่าระดับยับยั้งการเจริญตรงตำแหน่งที่มีการติด เชื้อ ซึ่งเป็นผลของการรักษาด้วยยาฆ่าเชื้อมาก่อน

ภายหลังการเพาะเชื้อที่เคยสัมผัสกับยาปฏิชีวนะในความเข้มข้นต่าง ๆ มาก่อนลงใน tryptic soy broth ที่ปราศจากยา เชื้อเหล่านี้ยังคงแสดงรูปร่างที่ผิดปกติบ้างบางเซลล์ เชื้อสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส ภายหลังการถูกสัมผัสกับแอมพิซิลลินมาก่อน จะมีความต้านต่อแอมพิซิลลินเพิ่มขึ้น และความต้านต่อเจนต้ามัยซินจะเพิ่มขึ้นด้วยในบางภาวะ โดยทำนองเดียวกัน เชื้อซูโดโมนาส แอรจิโนซ่าที่เคยสัมผัสกับเจนต้ามัยซินมาก่อนจะมีความต้านต่อเจนต้ามัยซินเพิ่มขึ้น และความต้านต่อแอมพิซิลลินจะเพิ่มขึ้นด้วยในบางภาวะเช่นกัน

Thesis Title Effects of Subinhibitory Concentrations of Ampicillin and Gentamicin on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Name Miss Nongluksna Sriubolmas

Thesis Advisor Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

Department Microbiology

Academic Year 1980

ABSTRACT

Subinhibitory concentrations of antibiotics could produce *in vitro* aberrant forms of bacteria that were similar to those observed in specimens and cultures from patients being treated with antibacterial agents. In this study, the minimal inhibitory concentrations of ampicillin and gentamicin on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were determined by broth dilution method. *S. aureus* and *P. aeruginosa* were grown in tryptic soy broth (TSB) containing minimal inhibitory concentration (MIC) and one-half and one-fourth the MIC of ampicillin or gentamicin for 4, 16 and 24 hr. The viable cell numbers were determined by enumerating the colony forming units per milliliter on tryptic soy agar plate. The obtained growth curves seemed to indicate that the bacteria could grow in these subinhibitory concentrations with longer exponential growth period than normal. The resulting organisms were examined by Gram staining and electron microscopy. It was found that the Gram staining smears showed giant cells in ampicillin-treated staphylococci, diplococcal forms in gentamicin-treated staphylococci,

filamentous and granular forms in ampicillin-treated *P. aeruginosa* and bipolar staining cells in gentamicin-treated *P. aeruginosa* in addition to the normal cells. Electron micrographs showed septum abnormality in ampicillin-treated staphylococci, rather round cells with and without two convex cross walls in gentamicin-treated staphylococci, septumless filaments with distribution of electron dense materials along the filaments in ampicillin-treated *P. aeruginosa*, and a number of vacuoles and changing in the distribution of ribosome in gentamicin-treated *P. aeruginosa*. Such abnormal forms could occasionally simulate the appearance of quite different species. These might indicate the presence of a subinhibitory antibiotic concentration at the site of infection as a result of prior antibacterial therapy.

After growing for 18 hr in drug-free TSB, the bacteria, which had been exposed to various concentrations of antibiotics, still exhibited abnormal shape in some cells. The pre-exposure *S. aureus* to ampicillin was found more resistant to ampicillin and, in some conditions, also to gentamicin. In the same manner, the gentamicin-pre-exposed *P. aeruginosa* was more resistant to gentamicin and, in some conditions, also to ampicillin.



ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my appreciation to Assistant Professor Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her valuable suggestions.

I am deeply indebted and grateful to Assistant Professor Dr. Santi Thoongsuwan, Associate Dean of Administrative Affairs, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful guidance, suggestions, criticisms and encouragement throughout the course of this study.

I also wish to express my deep gratitude to Doctor Tinrat Stitnimankarn, Professor and Chairman of the Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, for his kind cooperation in allowing me to use some of the equipments in his department.

To Assistant Professor Bamrung Tantisewie, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, and Assistant Professor Kleophant Thakerngpol, Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, I wish to express my deep sincere gratitude, for their kind cooperation in granting me to use some of the equipments in their departments, their advice, and helping me to carry out some parts of this work.

I also wish to express my sincere thanks to all the staffs of the Department of Microbiology for their cooperation and assistance.

Particular thanks are due to Mr. Chaiyoot Bouwatana, Medical Illustrator, Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, for making illustrations.

Finally, this study was partly supported by a grant of the Graduate School, Chulalongkorn University, which was gratefully acknowledged.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	IV
ENGLISH ABSTRACT.....	VI
ACKNOWLEDGEMENT.....	VIII
LIST OF TABLES.....	XI
LIST OF FIGURES.....	XIII
LIST OF ABBREVIATIONS.....	XV
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II MATERIALS AND METHODS.....	21
III RESULTS.....	35
IV DISCUSSION.....	70
V CONCLUSION.....	75
REFERENCES.....	76
VITA.....	85



LIST OF TABLES

Table	Page
1 Comparison of the compound microscope and the electron microscope.....	18
2 Solvents and diluents for stock solution of antibiotics.....	26
3 MICs of ampicillin and gentamicin by broth dilution method.....	35
4 Numbers of cfu per ml of <i>Staphylococcus aureus</i> after incubation in TSB and TSB containing ampicillin.....	37
5 Numbers of cfu per ml of <i>Staphylococcus aureus</i> after incubation in TSB and TSB containing gentamicin.....	41
6 Numbers of cfu per ml of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> after incubation in TSB and TSB containing ampicillin.....	44
7 Numbers of cfu per ml of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> after incubation in TSB and TSB containing gentamicin.....	48

Table

Page

8	Percentages of abnormal cells of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> after incubation in TSB in the presence of one-half the MIC of ampicillin.....	51
9	MICs of ampicillin and gentamicin redetermined on ampicillin pretreated <i>Staphylococcus aureus</i> that subsequently grown in drug-free TSB for 18 hr....	64
10	MICs of ampicillin and gentamicin redetermined on gentamicin pretreated <i>Staphylococcus aureus</i> that subsequently grown in drug-free TSB for 18 hr....	66
11	MICs of ampicillin and gentamicin redetermined on ampicillin pretreated <i>Pseudomonas aeruginosa</i> that subsequently grown in drug-free TSB for 18 hr....	68
12	MICs of ampicillin and gentamicin redetermined on gentamicin pretreated <i>Pseudomonas aeruginosa</i> that subsequently grown in drug-free TSB for 18 hr....	69

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Protein biosynthesis illustrating sites of action of agents that inhibit protein synthesis...	13
2	The diagram illustrated the contrast being produced from a particle negatively stained (A) and positively stained (B).....	20
3	Growth curves of <i>Staphylococcus aureus</i> incubated in the presence of subinhibitory concentrations of ampicillin and gentamicin in TSB for 4, 16 and 24 hours.....	38
4	Growth curves of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> incubated in the presence of subinhibitory concentrations of ampicillin and gentamicin in TSB for 4, 16 and 24 hours.....	45
5	<i>Staphylococcus aureus</i> grown for 16 hr (A) in drug-free TSB and (B) in the presence of one-half the MIC of ampicillin in TSB. Gram stain. x 3,300.	50
6	<i>Staphylococcus aureus</i> grown for 16 hr (A) in drug-free TSB and (B) in the presence of one-half the MIC of ampicillin in TSB. Negatively stain. x 13,200.....	52

Figure	Page
7 <i>Staphylococcus aureus</i> grown in the presence of one-half the MIC of gentamicin in TSB for 16 hr. Gram stain. x 3,300.....	54
8 <i>Staphylococcus aureus</i> grown in the presence of one-half the MIC of gentamicin in TSB for 16 hr. Negatively stain. x 13,200.....	55
9 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> grown for 16 hr (A) in drug-free TSB and (B) in the presence of one-half the MIC of ampicillin in TSB. Gram stain. x 3,300	57
10 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> grown in drug-free TSB for 16 hr. Negatively stain. x 13,200.....	58
11 (A and B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> grown in the presence of one-half the MIC of ampicillin in TSB for 16 hr. Negatively stain. A x 13,200, B x 15,400.....	59
12 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> grown in the presence of one-half the MIC of gentamicin in TSB for 16 hr. Gram stain. x 3,300.....	61
13 (A and B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> grown in the presence of one-half the MIC of gentamicin for 16 hr. Negatively stain. A x 10,780, B x 18,700.	62

LIST OF ABBREVIATIONS

cm	Centimeter
cfu	Colony forming unit
conc ⁿ	Concentration
DNA	Deoxyribonucleic acid
Fig.	Figure
g	Gram
hr	Hour
in ²	Square inch
mRNA	Messenger ribonucleic acid
μg	Microgram
μm	Micrometer
mg	Milligram
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M	Molar
MIC	Minimal inhibitory concentration
min	Minute
nm	Nanometer
N	Normal
lb	Pound
P	Probability
sec	Second
S	Svedberg unit
tRNA	Transfer ribonucleic acid

TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth