

# DETECTION OF PENICILLINASE FROM COMMON PATHOGENS

นราทร ธรรมบุตร พ.บ.\*

## Introduction

Harper<sup>(1)</sup> เป็นคนแรกที่สังเกตเห็นว่า  
บาดแผลที่ใช้ Penicillin Ointment รักษา  
นั้น Discharge จากแผลมี inhibitory sub-  
stance ที่ทำลายยา Penicillin ได้

ต่อมา Abraham และ Chain<sup>(2)</sup> พบว่า  
มี Bacteria หลายชนิดที่สามารถสร้าง inhibi-  
tory substance นี้ได้ตั้งชื่อว่า Penicillinase  
และพิสูจน์ว่า Substance นี้เป็น Bacteriosta-  
tic effect ต่อยา Penicillin

## Principle

ปัจจุบันทราบกันทั่วไปแล้วว่า Bacteria  
ที่มี (2) Resistant ต่อ penicillin ได้นั้น  
สาเหตุอันหนึ่งเกิดขึ้นเพราะ Bacteria นั้น  
สามารถสร้าง penicillinase หรืออีกชื่อหนึ่ง  
เรียกว่า penicillin lactamase ซึ่ง enzyme  
นี้สามารถ catalyse และ hydrolyse — B —

lactam ring ของ penicillin molecule ทำ  
ให้ antibacterial activity ของ penicillin  
เสียไป

อย่างไรก็ดี Bacteria บางชนิดที่ไม่มี  
penicillinase ก็อาจจะมี resistant ต่อยา  
penicillin ได้<sup>(1)</sup> แสดงว่า Bacteria นั้นมี  
กลไกอื่นอันในการ inhibit และ destroy ยา  
penicillin ได้

## Purpose of Study

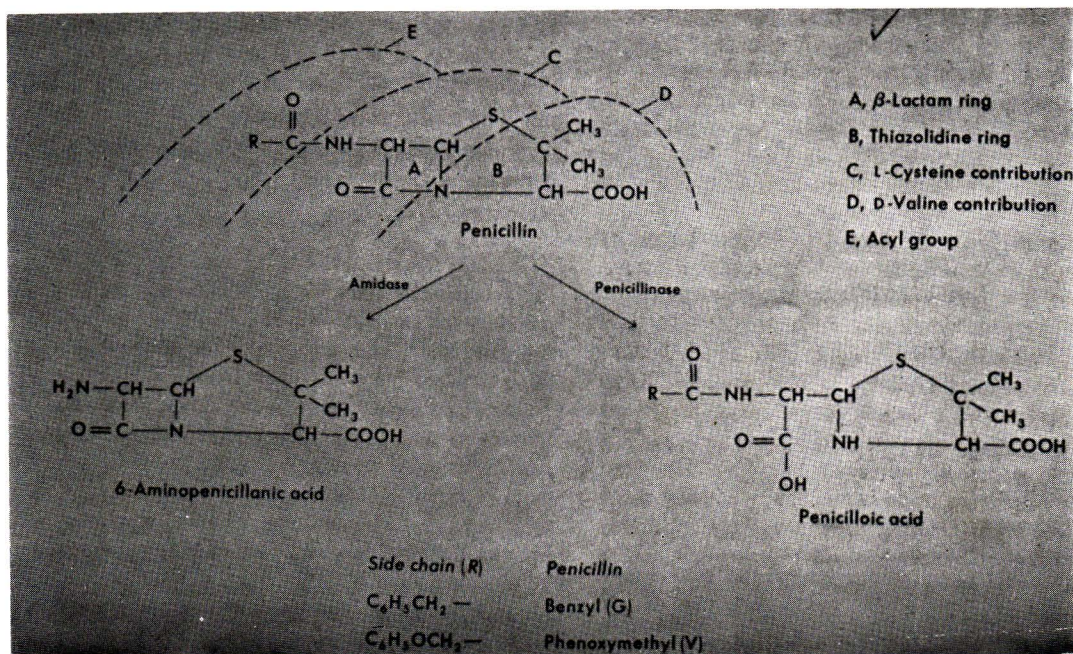
เพื่อตรวจดูว่า Pathogens ที่แยกได้มี  
Strain ใดบ้างที่ produce — Penicillinase

## Materials

Materials ที่ใช้ในการทดลองนี้

1. ใช้ common pathogens ชนิด  
ต่าง ๆ ที่แยกได้จาก specimen ต่าง ๆ ใน  
ร.พ. จุฬาลงกรณ์

\* แผนกวิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ๑. Structure of some natural Penicillins and derivatives

๒. Penicillin ที่ใช้ในการทดลองคือ Crystalline penicillin G Sodium 500,000 U. ของ Hoechst, Lot. No. "L"

๓. Standard Strain # 9 เป็น (5) Staphylococcus albus ซึ่ง prove แล้วว่าไม่ develop mutant ง่ายเป็น penicillin sensitive bacteria

**Procedure & Method**(4)

Each of the bacterial strains isolated is inoculated in trypticase soy broth (Pneumococcus and Streptococcus in horse serum Todd Hewith broth) and incubated for 18 hrs. The culture is mixed

with equal parts of an aqueous solution of G-penicillin in concentrations of 1, 10, 100, and 1,000 Units/ml.

After one hour the mixtures are distributed in holes in a large nutrient agar plate on which a culture of standard strain staphylococcus albus # 9 has been seeded, poured beforehand.

The holes thus contain 0.5, 5, 50, and 500 Units of G-penicillin per ml. Two holes in each plate are filled with 0.5 and 5 Units of G-penicillin as control. The plates are incubated at 37° C for 18 hrs. and the inhibition zones read.(4)

**Interpretation the finding**(9)

ดู inhibition zone หลัง incubated 24 hrs.

๑. ถ้า mixture ของ bacteria และ penicillin ให้ inhibition zone เท่ากับ control แสดงว่า bacteria นั้นไม่ produce penicillinase.

๒. ถ้า mixture ของ bacteria และ penicillin ไม่มี inhibition zone แปลว่า penicillin ถูกทำลายหมด

๓. ถ้า mixture ของ bacteria และ penicillin มี zone น้อยกว่า control หมายความว่า penicillin ถูกทำลาย partially

อนึ่ง Designation ที่ใช้นั้น Develop ขึ้นเองเพื่อความสะดวกและง่ายในการ Report (7)

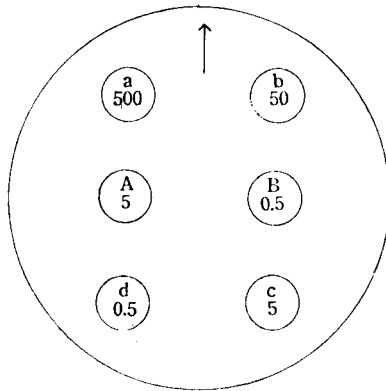


Fig. 2

- Wells.**
- a = 1 c.c. of Pathogen  $\bar{c}$  500 U. of Penicillin/c.c.
  - b = 1 c.c. of Pathogen  $\bar{c}$  50 U. of Penicillin/c.c.
  - c = 1 c.c. of Pathogen  $\bar{c}$  5 U. of Penicillin/c.c.
  - d = 1 c.c. of Pathogen  $\bar{c}$  0.5 U. of Penicillin/c.c.
  - A = Control high concentration 5 U./c.c.
  - B = Control low concentration 0.5 U./c.c.

**Table 1.** แสดงถึง Quantitative measure for Penicillinase production. (7)

Degree penicillinase production	A	B	a	b	c	d
4 +	+	+	0	0	0	0
3 +	+	+	+	0	0	0
2 +	+	+	+	+	0	0
1 +	+	+	+	+	+	0
0 +	+	+	+	+	+	+

N.B. + = Inhibition Zone  
0 = No inhibition Zone

**Result of Observation :**

งานนเรมทการ study ดงแตวนท ๒๙ ตุลาคม ๒๕๑๒ Pathogens ทงหมดทได  
รบัมาทการทดลองน ไดมาจาก Specimens ดาง ๆ ของผูบวยใน ร.พ. จุฬาลงกรณ

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Staphylococcus aureus, coagulase positive<br>(or coagulase negative) | 24 Strains   |
| 2. Streptococcus pyogenes   | 10 Strains   |
| 3. Diplococcus pneumoniae   | 5 Strains    |
| 4. Escherichia coli   | 16 Strains   |
| 5. Proteus groups   | 10 Strains   |
| 6. Pseudomonas aeruginosa   | 7 Strains    |
| 7. Salmonella groups  | 5 Strains    |
| 8. Klebsiella pneumoniae  | 10 Strains   |
| 9. Yeast like organisms   | 10 Strains   |
| 10. Bacillus subtilis   | 5 Strains    |
| Total strains   | 112 Strains. |

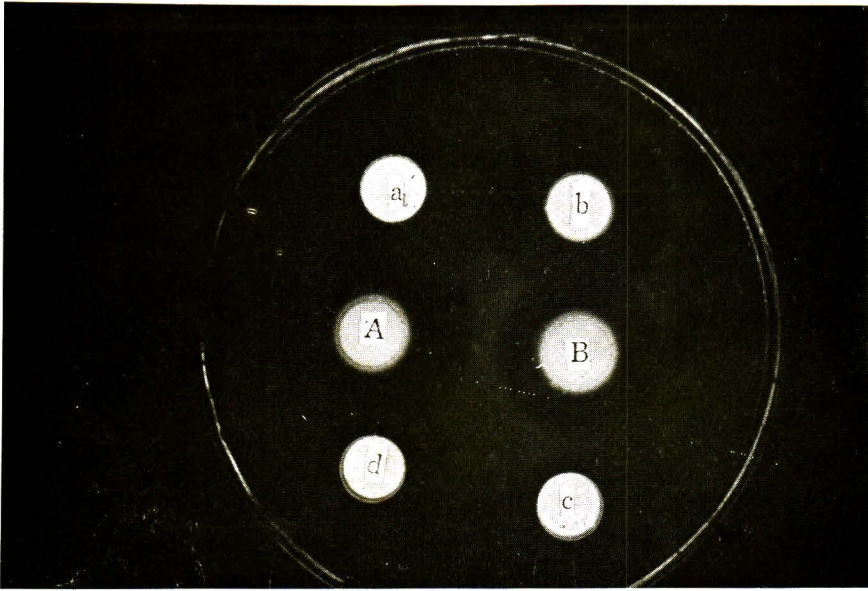


Figure 3 Showing Inhibition Zone around holes  
(Penicillinase production degree = 1<sup>+</sup>)

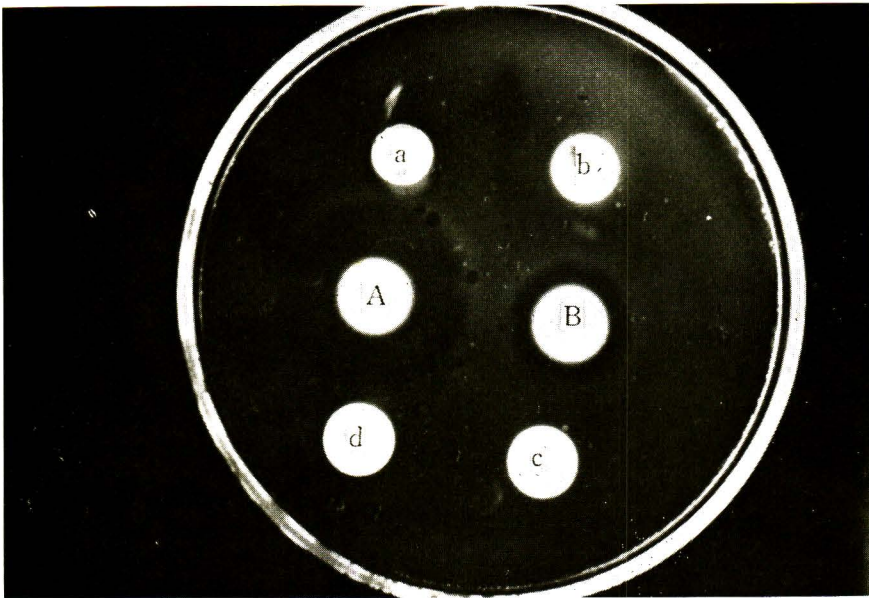


Figure 4 No Inhibition Zone  
(Degree of penicillinase production = 4<sup>+</sup>)

**Table 2** Penicillinase production from various pathogens.

Organisms	Penicillinase production (Degree)						Total Strains
	4 +	3 +	2 +	1 +	0 +		
1. Staphylococcus aureus (Coagulase positive)	2	4	11	3	4	24	
2. Streptococcus pyogenes	0	2	1	3	4	10	
3. Diplococcus pneumoniae	0	1	1	0	3	5	
4. Escherichia coli	9	2	5	0	0	16	
5. Proteus groups	3	2	6	4	0	10	
6. Pseudomonas aeruginosa	2	0	3	0	2	7	
7. Salmonella groups*	0	0	0	2	3	5	
8. Klebsiella pneumoniae	2	2	3	2	1	10	
9. Yeast like organisms	1	1	1	4	3	10	
10. Bacillus subtilis	4	1	0	0	0	5	

\* 1. S. derby  
 2. S. typhosa  
 3. S. para A  
 4. S. para B  
 5. S. java

**Table 3** Relation of Penicillinase and *S. Aureus* - Activities.

<i>Organisms</i>	<i>Degree of penicillinase production</i>	<i>Result No. of strains</i>	<i>Penicillin Sensitiveness</i>		<i>Coagulase test (Slide method)</i>	
			<i>sensitive</i>	<i>resistant</i>	<i>Positive</i>	<i>Negative</i>
<i>Staphylococcus Aureus.</i>	4+	2	0	2	2	0
	3+	5	1	4	5	0
	2+	11	1	10	10	1
	1+	3	0	3	3	0
	0+	4	1	3	4	0

**Comment**

ตาม Table ๒ เห็นได้ชัดว่า Pathogens โดยทั่วไป Produce penicillinase แต่บางชนิดจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของ Pathogens

Staphylococcus aureus และ E.coli เป็น Pathogens ที่สามารถ produce penicillinase ได้มาก ตรงกันข้ามกับพวก Salmonella Gr. ซึ่ง produce ได้น้อย

ผู้รายงานได้พยายามทำการ Study กับ เชื้อ N. gonorrhoeae โดยใช้ Bactophenol Red—Carbohydrate broth กับ ๕% sterile fresh rabbit serum<sup>(8)</sup> ผลที่ได้ไม่แน่นอน จึงไม่ได้รวบรวมไว้ใน Data

สำหรับ B. subtilis นั้นพบว่า produce penicillinase ได้มากที่สุด บังเอิญเคราะห์ดีที่ Bacteria นี้ไม่มีกลไกอื่นที่จะรุกราน (invasiveness) human being

จาก Table ๓ อาจพูดได้ว่า S. aureus ที่ Resist ต่อยา Penicillin และมี Coagulase test positive จะ produce Penicillinase มากหรือน้อยก็ได้

จาก Table ๒ ได้ทำการ study จาก เชื้อ Streptococcus pyogenes และเชื้อ

Diplococcus pneumoniae น้อยมาก ผู้รายงานจะ study ต่อไป เพื่อดูว่า บาง strain ของเชื้อเหล่านี้ produce Penicillinase มากหรือน้อยเพียงใด

**Summary :**

Detection of penicillinase by simple laboratory methods are performed in order to see the pathogens that produce the enzyme “Penicillin Lactamase”

**สรุปรายงานของขอขอบคุณ**

๑. ท่านอาจารย์ หัวหน้าแผนกจุลชีววิทยาที่อนุญาตให้ทำการ Study นี้ในแผนก
๒. อาจารย์ นายแพทย์ดิลก เย็นบุตร อาจารย์ แพทย์หญิง สมใจ เหมชัยประยูร ที่กรุณาแยก Fresh Pathogens จาก Specimens ต่าง ๆ ส่งมาให้ทำการ Study
๓. Dr. Mandle แห่งวิทยาลัย Jefferson, Philadelphia ที่ให้ Standard Strain ของ ATCC มา
๔. อาจารย์ นายแพทย์ดิลก เย็นบุตร ที่กรุณาแก้ไขและนำทดลองมา
๕. คุณมณฑาทิพย์ แสงทวีป และคุณวันชัย สิงห์สุวรรณ ที่ช่วยทำการ Study และ Analyze Data ต่าง ๆ



**References**

1. Harpes, G.J., Inhibition of penicillin in routine culture media, *lancet* 2: 569-571, Nov. 6, 1943.
  2. Abraham, E.P., and Chain, E., An enzyme from bacteria able to destroy penicillin, *Nature* 146 : 837, Dec. 28, 1940.
  3. Davis Text Book of Microbiology, 4 th. Edition, Page 311, 312. (1968)
  4. Erna Lung (1967) Danish State Serum Institute - Revised method from Bondi and Dietz, 1944.
  5. With the complement from J.P. Mandle Ph.D., Prof. of Microbiology, Jefferson Medical College, Philadelphia, 1969.
  6. Erna Lung (1987) - Danish State Serum Institute.
  7. Narathorn's self Table - analysis. (1970).
  8. Faber, Gonzales and Pelezer, Media for Nesseriac groups *Am. J. Clin. Path.*, 18, 256 : 1948.
-