

การประเมินผลการทดสอบความไวของยาต่อบัคเตรี  
โดยวิธีหาความเข้มข้นต่ำสุดและวิธีการใช้กิสค์



นางสาววิชา ฉันทพิชญ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาโท สาขาสาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2527

ISBN 974-563-530-8

009387

17526863

EVALUATION OF DRUG SENSITIVITY TESTS AGAINST  
BACTERIA BY MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION  
AND DISC METHODS

Miss Vitchaya Chantatipyan

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 974-563-530-8

**Thesis Title** Evaluate of Drug Sensitivity Tests Against  
Bacteria by Minimal Inhibitory Concentration  
and Disk methods.  
**By** Miss Vitchaya Chantatipyan  
**Department** Microbiology  
**Thesis Advisor** Kriengsag Saitanu, Ph.D.  
Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.



---

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

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

**Thesis Committee**

*Saree Virumhaphol*.....Chairman  
(Associate Professor Saree Virumhaphol)

*Kriengsag Saitanu*.....Member  
(Kriengsag Saitanu, Ph.D.)

*Aurapin Rudeechuen*.....Member  
(Associate Professor Aurapin Rudeechuen)

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

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การประเมินผลการทดสอบความไวของยาก่อแบคทีเรีย โดยวิธี  
 ทดหาความเข้มข้นต่ำสุดและวิธีการใช้ดิสก์  
 ชื่อผู้ศึกษา นางสาว วิชญา ฉันทพิศญา  
 อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ นายสัตวแพทย์ คร. เกรียงศักดิ์ สายธนู  
 รองศาสตราจารย์ คร. สันติ ดุงสุวรรณ  
 ภาควิชา จุลชีววิทยา  
 ปีการศึกษา 2526



บทคัดย่อ

วิธีการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่าปฏิชีวนะที่ใช้ในทางปฏิบัติขณะนี้  
 คือวิธี disk diffusion method, broth dilution method และ agar  
 dilution method ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป การเลือกใช้ให้เหมาะสมกับ  
 ห้องปฏิบัติการจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดสอบ อย่างไรก็ตาม ในแต่ละวิธีการจะมี  
 ข้อเสียที่เหมือนกันคือ ในการอ่านผล จำเป็นต้องใช้เวลาประมาณ 18-20 ชม.

การทดลองนี้เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของ modified broth dilution method  
 เปรียบเทียบกับวิธี disk diffusion method ในการทดสอบหาความไวของ  
 เชื้อแบคทีเรียชนิด aerobic bacterie ที่เรียกว่าปฏิชีวนะ

เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคริดิเคื้อทางเดินอาหาร จำนวน 125 เสกตรน  
 ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในระหว่าง ปี พ.ศ. 2520 - 2525 ได้นำมาทำการทดสอบหา  
 ความไวต่อก่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี modified broth disk method โดยใช้  
 BBL antibiotic disks 12 ชนิด และ local disks 8 ชนิด  
 อ่านผลของวิธี modified broth disk ที่เวลา 3, 6, 8, 18 ชม. กาล่ากับ  
 ผลความไวของเชื้อก่อยาจากวิธีนี้นำมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธี modified broth disk  
 นำมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธี disk diffusion และวิธี MIC dilution methods

ความไวของเชื้อคอตยาซึ่งทดสอบโดยวิธี modified broth disk method เมื่ออ่านผลที่เวลา 6 ชม. จะให้ผลใกล้เคียง ( $p < 0.20$ ) มากที่สุดกับผลที่ได้จากวิธี disk diffusion and MIC methods .

ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า วิธี modified broth disk สามารถนำมาใช้เพื่อการทดสอบความไวของเชื้อคอตยาปฏิชีวนะโดยอ่านผลได้เร็วกว่าวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน อย่างน้อยที่สุด สำหรับใช้กับเชื้อในกลุ่ม *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งต้องการทดสอบความไวคอตยา เทตราซัยคลิน, คลอแรมเฟนิคอล, โคทรัยม็อกซาโซล, เพนนิซิลลิน, โพลิมิกซิน หรือเมื่อทดสอบความไวของเชื้อกลุ่ม *Shigella* คอตยา กานามัยซิน และเชื้อ *E. coli* คอตยา เจนทามัยซิน

ผลจากการเปรียบเทียบความไวของเชื้อคอตยาโดยวิธี disk diffusion และ modified broth disk จากการใช้กระดาษยา BBL และกระดาษยาที่ผลิตภายในประเทศ พบว่า 20% และ 15% ของจำนวนผลที่ได้ทั้งหมดจากวิธี disk diffusion และวิธี modified broth disk ตามลำดับ จะแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ความไวของเชื้อจากการใช้กระดาษยาที่ผลิตภายในประเทศสูงกว่าผลที่ได้จากกระดาษยา BBL disk และมี 32.5% และ 50% ของจำนวนผลทั้งหมด ที่แสดงถึงเปอร์เซ็นต์ความไวของเชื้อที่เท่ากันจากการใช้กระดาษยาทั้งสองชนิด มีจำนวนผล 47.5% และ 35% ของทั้งหมด ซึ่งแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ความไวของเชื้อที่ได้จากการใช้กระดาษยา BBL สูงกว่า จากการใช้กระดาษยาที่ผลิตภายในประเทศตามลำดับ

ค่า MIC ซึ่งได้จากการใช้วิธี agar dilution, broth dilution method จะสัมพันธ์กัน โดยเปอร์เซ็นต์ความไวของเชื้อจากวิธี disk diffusion และ MIC dilution methods จะสอดคล้องกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $p < 0.20$ ) สำหรับเชื้อทุกชนิดที่ทดสอบคอตยาทุกชนิด ยกเว้น โพลิมิกซิน ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ความไวของเชื้อคอตยาซึ่งได้จากการทดสอบทั้งสี่วิธี แสดงให้เห็นอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $p < 0.20$ ) ในเชื้อกลุ่ม *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus* ซึ่งทดสอบกับยา เทตราซัยคลิน, คลอแรมเฟนิคอล, เพนนิซิลลิน, แอมพิซิลลิน, และเชื้อ *Shigella* คอตยา กานามัยซิน

**Thesis Title** Evaluation of Drug Sensitivity Tests against  
Bacteria by Minimal Inhibitory Concentration  
and Disk Methods

**Name** Miss Vitchaya Chantatipyan

**Thesis Advisors** Kriengsag Saitanu, Ph.D.  
Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

**Department** Microbiology

**Academic Year** 1983



## ABSTRACT

The current methods for testing the antimicrobial susceptibility in general practice are the conventional disk diffusion, broth dilution and agar dilution methods. Each method has the advantage and disadvantages individually to serve the purpose of different laboratories. However, the same distinct disadvantage in all methods is the prolonged (18-20 hrs.) incubation period required.

The present study is to evaluate the correlation of the modified broth disk method with other conventional procedures for the antimicrobial susceptibility in aerobic bacteria.

A total of 125 strains of the clinically common pathogenic enterobacteria including different genera, which are the major diarrhoeal causative microorganisms, isolated during the period of year 1977-1982 were tested for antimicrobial susceptibility by the modified broth disk

method using 12 imported disks of different antibiotics compared with 8 local disks. The results of modified method was recorded at 3, 6, 8, 18 hrs. after incubation. Additionally, the modified broth disk method was then tested in comparison to disk diffusion and MIC dilution methods.

The overall results demonstrated that the results of modified broth disk method reading at 6 hrs. showed closer agreement than the 18 hrs. reading, with those from disk diffusion and the MIC methods. This study demonstrated the feasibility of using the modified broth disk method as a rapid antimicrobial susceptibility determination for Salmonella sp., Shigella sp, E. coli, V. cholerae and V. parahaemolyticus tested against Tetroccline, Chloramphenico, Co-trimoxazole, Peni-cillin, Polymyxin-B also for Shigella sp tested against Kanamycin, and E. coli tested against Gentamicin.

Comparing the results obtained testing disk diffusion and modified broth disk method obtained using BBL and local disks. There were 20% and 15% of tests demonstrated the higher percentage susceptibility obtained in local disks as determined by the disk diffusion and modified broth disk respectively. There were 32.5% and 50% showed the equal percentage susceptibility in BBL disk than local disk as determined by the disk diffusion and modified broth disk respectively.

The MIC's obtained testing the agar and broth dilution were quite related. The bacterial percentage susceptibility using the disk diffusion and MIC dilution methods were significantly in agreement ( $p < 0.20$ ) for all tested organism against all antibiotic (except PM).

The agreement in percentage susceptibility ( $p < 0.20$ ) obtained using the four methods were demonstrated with Salmonella sp., Shigella sp., E. coli., V. parahaemolyticus tested against Tetracycline, Chloramphenical, Penicillin, Ampicillin and also demonstrated with Shigella sp. tested against KM.





## ACKNOWLEDGEMENTS

I am greatly indebted and especially grateful to my advisor, Dr. Kriengsag Saitanu, the Division of Microbiology, the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, for offering me numerous encouragement, assistance, guidance and miscellaneous critiques also the provision of all laboratory instruments throughout the study.

**Assôciate Professor Dr. Santi Thoongsuwan, Associate Dean of** Administrative Affairs and Head of the Department of Microbiology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University has my special thanks for his helpful suggestions and comments.

Khun Vimolmas Lipipan, Khun Pintip Pongpech and all the lecturers of the Department of Microbiology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. Each has my special appreciation for their kind cooperation, assistance and generous permission to use some of the instruments in the laboratory.

I also would like to express my special thanks to all the staff members of the Division of Microbiology, the Medical Scientific Research Department of Thailand, who kindly supplied me the specific strains of microorganism and their skillful helps.

And, finally, my sincere thanks to Khun Tipparat Termwat for her cheerful and skillful typing.



## CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	vi
ACKNOWLEDGEMENTS.....	viii
TABLES.....	x
FIGURES.....	xiii
ABBREVIATION.....	xv
CHAPTER	
1 INTRODUCTION.....	1
2 MATERIALS AND METHODS.....	21
3 RESULTS.....	49
4 DISCUSSION.....	88
5 CONCLUSION.....	99
REFERENCES.....	101
APPENDIX.....	109
VITA.....	117

## TABLES

TABLE	PAGE
1 Data of Cholera epidemic in Thailand and percentage of death .....	13
2 Current use of antimicrobial agents and the therapy of infections .....	14
3 Antimicrobial susceptibility report 1979 - Ramathibodi hospital .....	16
4 List of antibiotic and attainable MIC and urine levels that can be expected for different dosage via several routes of administration .....	18
5 Antibiotic disks in modified broth disk and disk diffusion methods .....	28
6 Antibiotic powder and injections used in dilution methods .....	29
7 Solvents and diluents for stock solutions of antimicrobials .....	30-31
8 Procedures for preparing stock solutions .....	32-33
9 Final antibiotic concentration in modified broth disk method .....	36

TABLE	PAGE
10 Zone sizes and their interpretation for frequently used Chemotherapeutics .....	39-40
11 Final antibiotic concentration in plate .....	42
12 Zone diameter interpretive standards and approximate MIC correlates .....	43-45
13 The final antibiotic concentration in tube .....	48
14 Percentage susceptibility of organisms determined by modified broth disk method as compared with disk diffusion method using BBL disks .....	50-51
15 Percentage susceptibility of organisms as determined by modified broth disk and disk diffusion methods using BBL disks compared with the local disks .....	55-59
16 Percentage agreement of susceptibility results using BBL disks and local disks as determined by disk diffusion method tested against 125 strains of enteropathogens .....	60
17 Percentage agreement of susceptibility results using BBL disks and local disks as determined by modified broth disk method tested against 125 strains of enteropathogens .....	61-62

TABLE	PAGE
18 The Minimum Inhibitory Concentration of 30 strains of <i>Salmonella</i> as determined by broth dilution and agar dilution method .....	65
19 The Minimum Inhibitory Concentration of 15 strains of <i>Shigella</i> sp. as determined by broth dilution and agar dilution method .....	66
20 The Minimum Inhibitory Concentration of 10 strains of <i>E. coli</i> as determined by broth dilution and agar dilution method .....	67
21 The Minimum Inhibitory Concentration of 6 strains of <i>V. parahaemolyticus</i> as determined by broth dilution and agar dilution method .....	68
22/23 Percentage susceptibility of <i>Salmonella</i> sp. and <i>Shigella</i> sp. as determined by disk diffusion, modified broth disk , broth dilution and agar plate dilution method .....	84-85
24/25 Percentage susceptibility of <i>E. coli</i> and <i>V. parahaemolyticus</i> as determined by disk diffusion, modified broth disk (E. , broth dilution and agar plate dilution method .....	86-87

## FIGURES

FIGURE	PAGE
1 Streak plate technique .....	26
2 Line drawing of the broth dilution susceptibility test .....	47
3 Comparison of MIC's of agar dilution and broth dilution method obtained testing 30 strains of Salmonella sp. ....	69
4 Comparison of MIC's of agar dilution and broth dilution method obtained testing 15 strains of Shigella sp. ....	70
5 Comparison of MIC's of agar dilution and broth dilution method obtained testing 10 strains of E. coli .....	71
6 Comparison of MIC's of agar dilution and broth dilution method obtained testing 6 strains of V. parahaemolyticus ....	72
7 Cumulative percentage susceptibility of 30 strains of Salmonella sp. using broth dilution method .....	73
8 Cumulative percentage susceptibility of 15 strains of Shigella sp. using broth dilution method .....	74
9 Cumulative percentage susceptibility of 10 strains of E. coli using broth dilution method .....	75
10 Cumulative percentage susceptibility of 6 strains of V. parahaemolyticus using broth dilution method .....	76

FIGURE	PAGE
11 Cumulative percentage susceptibility of 30 strains of Salmonella sp. using agar dilution method ..... 77	77
12 Cumulative percentage susceptibility of 15 strains of Shigella sp. using agar dilution method ..... 78	78
13 Cumulative percentage susceptibility of 10 strains of E. coli using agar dilution method ..... 79	79
14 Cumulative percentage susceptibility of 6 strains of V. parahaemolyticus using agar dilution method ..... 80	80

## ABBREVIATION



AM	Ampicillin
CFU	Colony Forming Unit
CL	Colistin
CM	Chloramphenicol
CO	Co-trimoxazole
GM	Gentamicin
KM	Kanamycin
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NA	Not available
NM	Neomycin
PM	Polymyxin-B
PN	Penicillin
SDZ	Sulphadiazine
SM	Streptomycin
TC	Tetracycline
UG	Microgramme