



Antimicrobial susceptibility patterns and resistance transferability among bacteroides fragilis group isolates from patients with appendicitis in Bali, Indonesia

Suata, I Ketut

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1702

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001702>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(国籍)	イ ケツット スマタ I Ketut Suata	(インドネシア)
博士の専攻 分野の名称	博士 (医学)	
学位記番号	博ろ第1343号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成5年3月8日	
学位論文題目	Antimicrobial Susceptibility Patterns and Resistance Transferability among <i>Bacteroides fragilis</i> group Isolates from Patients with Appendicitis in Bali, Indonesia. インドネシア・バリ島における虫垂炎患者より分離された <i>Bacteroides fragilis</i> group の化学療法剤に対する感受性と 薬剤耐性の伝達	
審査委員	主査 教授 本 間 守 男 教授 松 村 武 男 教授 上 野 一 恵	教授 守 殿 貞 夫

論文内容の要旨

SUMMARY

Among the anaerobes, members of the *Bacteroides fragilis* group are the pathogens most frequently isolated from humans. In recent years, resistance to clinically useful antibiotics has increased in these organisms which has been attributed to multiple mechanisms of resistance. Conjugation has been found to be the major mechanism of drug resistance transfer in the *B. fragilis* group. Transfer of tetracycline resistance (Tet^R) quite common in intestinal *Bacteroides* species has been correlated with Tet^R element whose location is still being debated. But the transfer of Tet^R has been found to be inducible by subinhibitory concentration of tetracycline. A number of reports on susceptibility patterns and transfer of resistance among organisms of the *B. fragilis* group are now available; most have come from cities in developed countries, but until now no such data have been reported from Indonesia. The aims of the present study were to determine the susceptibility patterns of *B. fragilis* group isolates from patients with acute appendicitis in Bali, Indonesia; to study Tet^R transfer from resistant strains and its role in the emergence and spread of antibiotic resistance phenotypes in the presence of subinhibitory concentrations of tetracycline; and to investigate the mechanisms of resistance by means of plasmid analysis.

A total of 155 strains of *B. fragilis* group isolates from patients with acute appendicitis in Bali, Indonesia have been studied. The patients involved underwent appendectomy; a

narrow slice of the appendiceal wall was cut tangentially, with careful avoidance of the lumen. Species were identified with the Rap ID ANA II System. Antimicrobial susceptibility was evaluated by a microbroth dilution technique; mating was performed with use of a membrane filter; and cells from donor and transconjugant cultures were lysed by an alkaline lysis method, and plasmid was isolated and analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis.

Metronidazole and chloramphenicol were the most effective antimicrobial agents against all species of the *B.fragilis* group tested with no resistance and a resistance rate of 0.6% respectively. Amongst beta-lactam drugs, cefoxitin was the most active, with a resistance rate of 2%; next were carbenicillin and cefotaxime, with resistance rates of 6% and 8% respectively. Cephalothin was less active, with a resistance rate of 35%. Tetracycline and erythromycin also showed poor activity, with resistance rate of 16% and 27%, respectively. Clindamycin was ineffective against 10% of strains. *B.fragilis*, the most commonly encountered species of this group, is more susceptible to beta-lactam antibiotics than are the other species tested. Overall susceptibility patterns with exception of beta-lactam drugs were comparable to reports from other countries. The rate of resistance to clindamycin increased from 4% to 13% during 1988-1990. The number of isolates tested was not large enough for significant conclusion, but this development is alarming and may limit the alternative for antibiotic treatment of serious infections. We found also one chloramphenicol resistant strain (MIC, 32 μ g/mL) that requires further evaluation. The mechanism of resistance and inactivation of chloramphenicol by this strain was not determined. In light of the changing patterns of susceptibility, it seems that periodical monitoring of these patterns in organisms of the *B.fragilis* group in Indonesia is needed, with the resultant data used to guide empirical therapy for infections caused by these organisms.

Seventy of the 98 Tet^r strains (MIC ≥ 8 μ g/mL) were selected at random and use for filter mating experiments. Growth of donor bacteria in BHIS broth with tetracycline (2 μ g/mL) before filter mating increased the rate of transferability; that is, Tet^r was transferred to 40 of 70 strains after tetracycline induction and to 25 of 70 strain without use of tetracycline. Of the former 40 strains, 31 showed increase in transfer frequency of $\geq 10^2$ per input donor (Traⁱ); and the remaining nine showed less or no effect on transfer frequency (Tra^c). Low-concentration tetracycline induction has an important bearing on transferability and transfer frequency. Transferability was enhanced by tetracycline induction in inducible (Traⁱ) strains over that without induction ($P < .05$). Thus the risk of transfer of drug resistance may be substantial with the use of subinhibitory concentration of tetracycline e.g. for prophylaxis of infections or supplementation of animal feeds. Of the 40 donor strains able to transfer Tet^r only 15 had plasmids. Plasmid analysis revealed no bands in

transconjugants derived from five of these 15 plasmid-containing donor strains; in contrast, plasmid bands were detected in 20%-70% of the transconjugants from the remaining 10 donor strains. Not all of the transconjugants had a common plasmid band like that documented in donor strains. Thus, even in studies with 40 clinical isolates of the *B. fragilis* group, we found no association between the presence of plasmids and the transfer of Tet^r.

Twelve of the Tet^r, Cln^r strains were used for studies of the co-transfer of Tet^r and Cln^r. We found that Tet^r and Cln^r were co-transferred by only five of the 12 donor strains. Of these five strains, only one had detectable plasmid; it was interesting that the transconjugant derived from this strain lacked detectable plasmid - a finding suggesting that plasmid played no role in co-transfer of resistance in this strain. Our results suggest that the Cln^r element may be located in the chromosome. It is possible that the Tet^r element mobilizes the Cln^r determinant from the resistant to the susceptible strain. If so, this phenomenon may partially account for increasing resistance to clindamycin.

We report herein what we believe to be the first study (from any country) in which not only susceptibility patterns but also resistance transferability and plasmids have been analysed for many clinical isolates of the *B. fragilis* group.

論文審査の結果の要旨

Bacteroides fragilis group はヒトの感染症から分離される頻度が高い嫌気性グラム陰性杆菌である。近年この菌群における化学療法剤耐性、例えば tetracycline (TC), clindamycin (CLDM), cefoxitin (CFX) 耐性などが問題となっている。ここ 10 年間の研究で *B. fragilis* group の間での化学療法剤耐性の伝達は好気性菌の場合と同様に、接合によって起こることが明らかとなった。例えば TC 耐性の伝達は接合により伝達し、TC によって誘導される。その耐性遺伝子は染色体上に TC 耐性伝達エレメントとして存在するとされる。また CLDM 耐性の伝達も接合により伝達する。その耐性遺伝子はプラスミド上、あるいは TC-CLDM 耐性伝達エレメントとして染色体上に存在する。さらに TC 耐性伝達エレメントは CLDM 耐性や β -lactam 剤耐性などを可働する能力があることも明らかとなった。

さてこれまでのアメリカ、カナダ、ヨーロッパ、日本など先進国での研究によると、*B. fragilis* group の化学療法剤感受性が国、地域、病院単位で異なることは明白で、それぞれの単位での感受性の定期的なモニタリングが適切な empirical therapy を行う上で必須であるとされる。しかし残念ながら、インドネシアにおけるこの種の研究は皆無である。

申請者はインドネシア（バリ島）における *B. fragilis* group の主要化学療法剤に対する感受性の現況を調査した。引き続いて *B. fragilis* group における TC 耐性および CLDM 耐性に着目し、これらの耐性菌の耐性伝達能および耐性遺伝子をプラスミドに有する株が存在するか否かの検討を実施した。

申請者はこの目的を達成するために、バリ島の虫垂炎患者の虫垂摘出術で得られた虫垂組織を材料とし *Bacteroides Bile Esculin* 培地を用いて *B.fragilis* group を分離・同定し、それらの薬剤感受性を微量液体希釈法により測定した。さらに T C 耐性菌株について、フィルター交配法による耐性伝達実験および内在するプラスミドの解析を実施した。

その結果は以下のように要約される。

1. Metronidazole に対する耐性は全く認められず、chloramphenicol に対する耐性は 1 株に認められたのみであった。CFX、CLDM に対する耐性率はそれぞれ 2、10% であった。T C 耐性は 63% と *B.fragilis* group に浸淫していた。

2. T C の耐性株 70 株の T C 耐性伝達能を検討した。T C での誘導により 70 株中 40 株で耐性伝達が見られた。40 株中 31 株は誘導により耐性伝達頻度が 100 倍以上増加した。誘導のない場合にも 70 株中 25 株で耐性伝達が見られた。

3. T C 耐性伝達能があることが確かめられた 40 株中、25 株はプラスミドを保有しなかった。15 株はプラスミドを保有していた。プラスミドを保有する 15 株から得られた複数のトランスコンジュガントの中には耐性を示しながら親株のもつプラスミドのいずれをも持たないものが必ず存在した。

4. T C 耐性で CLDM にも耐性を示す株が 12 株存在した。これらの 12 株中 5 株では T C 耐性と CLDM 耐性が同時に伝達した。5 株中 4 株にはプラスミドが存在しなかった。残りの 1 株はプラスミド保有したが、そのプラスミドは耐性伝達とは無関係であった。

以上の成績から、インドネシアの *B.fragilis* group の化学療法剤耐性の現況が明らかとなった。インドネシアにも先進国と同様に伝達性の T C 耐性が蔓延しており、それらの株の耐性伝達はプラスミドの関係しない様式をとっていることが明らかとなった。またすでに先進国で見られる T C-CLDM 耐性エレメントを有する株も存在することも明らかとなった。この研究成績は、インドネシアの虫垂炎の穿孔に引き続いておこる腹膜炎の化学療法における empirical therapy を行う上で大変貴重である。またこの研究は発展途上国における *B.fragilis* group の化学療法剤感受性に関する数少ない疫学的研究のひとつであると同時に、*B.fragilis* group に於ける T C 耐性に関するこれまでにない大規模な疫学的研究でもあり、今後のアジア地区における *B.fragilis* group の化学療法に関する基礎的・臨床的研究に与えるインパクトは大なるものがあり、価値ある医学研究成績と認められる。

よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。