5

ความเกี่ยวพันระหว่างพลาสมิดและบีตาแลคแตเมสในเชื้อแบคทีรอยดีส แฟรกจิลิส

นางสาว อรุณลักษณ์ นาวานิรัติศัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2530

ISBN 974-567-541-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012899

I 10296967

PLASMIDS RELATED TO BETA-LACTAMASE IN BACTEROIDES FRAGILIS

Miss Aroonlug Nawaniruttisai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter - Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-541-5

Thesis Title	Plasmids Related to Beta-Lactamase in Bacteroides fragilis
By	Miss Aroonlug Nawaniruttisai
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Narathorn Dhamabutra, M.D.
Co-Advisor	Associate Professor Panida Jayanetra, M.D.
	Associate Professor Malai Vorachit, M.Sc.

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

Thavorn Vajrabhaya .....Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis committee :

D. Yenbutra .....Chairman

(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

Narathorn Dhamabutra .....Member

(Associate Professor Narathorn Dhamabutra, M.D.)

Panida Jayanetra .....Member

(Associate Professor Panida Jayanetra, M.D.)

Malai Vorachit .....Member

(Associate Professor Malai Vorachit, M.Sc.)

Chertsak Dhiraputra .....Member

(Assistant Professor Chertsak Dhiraputra, M.D., M.Sc.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความเกี่ยวพันระหว่างพลาสมิดและบีตาแลคแตเมสในเชื้อแบคทีรอยดีส แฟรกจิลิส

ชื่อนิสิต นางสาว อรุณลักษณ์ นาวานิรัติศัย

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ นราทร ธรรมบุตร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง พนิดา ชัยเนตร

รองศาสตราจารย์ มาลัย วรจิตร

สหสาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Bacteroides fragilis เป็น anaerobe ที่พบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อบ่อยที่สุดในเชื้อกลุ่ม anaerobe ด้วยกัน และมักพบปัญหาเชื้อดื้อต่อ penicillin ซึ่งเป็นยาตัวหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจาก anaerobe การศึกษาเชื้อกลุ่ม Bacteroides fragilis 90 สายพันธุ์ พบ 85 สายพันธุ์ สามารถสร้างเอ็นซัยม์ β-lactamase ซึ่งเป็นเอ็นซัยม์สำคัญในการทำลายยากลุ่ม β-lactam การศึกษาค่าของระดับความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ต่อยากลุ่ม β-lactam 3 ชนิด พบว่า MIC ของ ampicillin และ penicillin ต่อเชื้อส่วนใหญ่คือ 16-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน MIC ของ cefoxitin ต่ำกว่ายาสองชนิดแรกคือ 4-8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ศึกษาการถ่ายทอดความสามารถในการสร้าง β-lactamase จากสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา ampicillin มากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปยังสายพันธุ์ที่ไม่สร้าง β-lactamase จากตัวให้ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ พบตัวให้คือ B. ovatus 3 สายพันธุ์ ที่สามารถถ่ายทอดการสร้าง β-lactamase ให้ตัวรับซึ่งสามารถสร้าง β-lactamase, ดื้อต่อ ampicillin และ penicillin แต่ยังคงไวต่อ cefoxitin อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบพลาสมิดที่คุมการดื้อ penicillin, ampicillin ทั้งตัวให้และตัวรับ แต่ตัวให้ 2 สายพันธุ์ที่พบพลาสมิดขนาดเล็ก ๆ ซึ่งอาจไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อ ampicillin และ penicillin β-lactamase ของตัวรับใหม่ (transconjugant) มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคือ pI (isoelectric point) เหมือนสายพันธุ์ที่ถ่ายทอดให้ คือมีค่า pI ที่ 4.3 การศึกษาชนิดของ β-lactamase ในเชื้อกลุ่ม Bacteroides fragilis โดย

isoelectric focusing technique มีค่า pI อยู่ในช่วง 4.3-4.9 ซึ่งต่ำกว่า β-lactamase ของเชื้อชนิดอื่น ๆ β-lactamase ของ Bacteroides fragilis ส่วนใหญ่เป็นชนิดที่มีค่า pI 4.9 และส่วนน้อยที่มีค่า pI ที่ 4.9 และ 5.1 B. fragilis เหล่านี้ไม่สามารถถ่ายทอดการสร้าง β-lactamase ให้เชื้ออื่นได้ โดยวิธี conjugation ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวรับนั้นไม่ใช่ตัวรับที่เหมาะสม หรือยีนส์ควบคุมการดื้อยาของ B. fragilis อยู่บน chromosome

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Plasmids Related to Beta-Lactamase in Bacteroides fragilis

Name Miss Aroonlug Nawaniruttisai

Thesis Advisor Associate Professor Narathorn Dhamabutra, M.D.

Co-Advisor Associate Professor Panida Jayanetra, M.D.

Associate Professor Malai Vorachit, M.Sc.

Inter-Department Medical Microbiology

Academic Year 1986

ABSTRACT

Bacteroides fragilis is the most frequently isolated anaerobe from the clinical specimens. Most B. fragilis produces β-lactamase enzyme that hydrolyse penicillin and ampicillin. The study on 90 strains of B. fragilis group revealed that 85 strains produced β-lactamase enzyme. The minimum inhibitory concentration (MIC) to ampicillin and penicillin G of the majority of strain was between 16 and 32 µg./ml. Cefoxitin which was a β-lactamase stable antibiotic had lower MIC than ampicillin and penicillin i.e. 4-8 µg./ml. Three strains of B. ovatus were able to transfer ampicillin resistance to a strain of non-β-lactamase producing B. vulgatus by filter mating technique. The transconjugants had a substantial increasing in β-lactamase activity and the MIC of ampicillin and penicillin G. The property of β-lactamase (pI) from the transconjugants was 4.3 similar to their donors. However there was no plasmid found in the donor, and the transconjugants, except the two strains of donor contained some small plasmids. The β-lactamase of B. fragilis group focused in the acid range (pI 4.3-4.9) which were unusually lower than

β-lactamase from most aerobic bacteria. Most B. fragilis produced β-lactamase with pI 4.9 and a few strains of B. fragilis produced β-lactamase with another minor band at pH 5.1. These B. fragilis strains did not transfer the ampicillin resistant to the ampicillin susceptible recipient by conjugation. This may due to the unappropriate recipient or the ampicillin resistant determinant was located on the chromosome.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

This thesis would never have been successed without any heartfully supports and advices of the following persons whom I would like to express my heartful thanks to their valuable helps. Their great assistance will be memorable to me and to those who find the usefulness of this work.

My deeply appreciation to :

Associate Professor Dr. Narathorn Dhamabutra, Division of Anaerobe, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for his valuable advices, strongly encouragement and constructive criticisms.

Associate Professor Dr. Panida Jayanetra, Division of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, my co-advisor, for her valuable advices, encouragement and constructive criticisms.

Associate Professor Malai Vorachit, Division of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, my co-advisor, for her valuable helps, collecting bacterial strains and guidance of the isoelectric focusing technique.

Assistant Professor Dr. Chertsak Dhiraputra, Division of Anaerobe, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, for his kindness, help in collecting bacterial strains, and comments.

Assistant Professor Dr. Boonlaw Sripayak, Department of Obstretic and Gynecology, Chulalongkorn Hospital Medical School, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his kindness, help in collecting specimens for anaerobic culture.

Associate Professor Dr. Tada Sueblinvong, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Dr. Watanalai Panbangred, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Mahidol University, for their kindness, helpful guidance of the plasmid study.

Miss Wilai Saksirisumpun, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her guidance of the enzyme preparation by ultrasonic disintegrator.

The staffs and personels in the Department of Microbiology and Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Scientific Division of Red Cross Society, for their enthusiastic co-operation and supply the equipments needed for the laboratorial work.

The staffs and personels in the Division of Medical Illustration for their valuable aid in photographic work.

The committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

Finally, I am deeply indebted to my family for their help, encouragement and understanding.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....vi

ACKNOWLEDGEMENT.....viii

LIST OF TABLES.....xiii

LIST OF FIGURES.....xiv

ABBREVIATIONS.....xv

OBJECTIVES.....xvii

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

LITERATURE REVIEW.....4

THE STUDY OF β-LACTAMASE.....4

Criteria Used in the Characterization of β-lactamases.....4

Classification of β-lactamases.....6

Plasmid mediated Beta-lactamases.....10

Beta-lactamase of Bacteroides fragilis Group.....13

Principle of Isoelectric Focusing Technique.....18

Polyacrylamide Gels.....19

The Process of Polymerization.....19

THE STUDY OF PLASMID.....20

Principle of Plasmid Isolation.....20

II. MATERIALS AND METHODS.....22

Materials

1. Bacterial Strains.....22

2. Ingradients and Media.....22

Page

3. Antibiotic Solutions.....25
4. Nitrocefin Solution.....26
5. Reagents for Plasmid Extraction.....26
6. Reagents for Isoelectric Focusing Study.....27
7. Equipments.....28
Methods.....30
1. Detection of β-lactamase.....30
2. Determination of Antibiotic Susceptibility.....31
3. Determination of Minimum Inhibitory Concentration.....31
4. Bacterial Conjugation.....33
5. Preparation of Partially Purified Plasmid DNA.....34
6. Agarose Gel Electrophoresis for Plasmid DNA.....35
7. Determination of the Isoelectric Point of β-lactamases.....35
III. RESULTS.....38
1. β-lactamase Production.....38
2. Minimum Inhibitory Concentration.....38
3. Transferability of β-lactamase Production.....39
4. The Study of Plasmid Extraction.....39
5. Isoelectric Focusing Study.....40
IV. DISCUSSION.....41
V. CONCLUSION.....46
REFERENCES.....69
VITA.....83

LIST OF TABLES

Page

Table

1. Properties of Plasmid Mediated β-Lactamases by Various Investigators.....48
2. The Isoelectric Points of β-Lactamases from Bacteroides fragilis Group.....49
3. Properties of β-Lactamases from B. fragilis group.....50
4. Test Concentrations of Antibiotics.....51
5. Sources of Bacteroides Strains in this Study.....52
6. β-Lactamase Activity of Bacteroides Strains Isolated from the Clinical Specimens.....53
7. Minimum Inhibitory Concentration of Bacteroides fragilis Group from the Clinical Isolates.....54
8. The Range of MIC, MIC_{50} and MIC_{90} of Bacteroides fragilis Group to β-Lactam Antibiotics.....55
9. Number of Bacteroides Strains with Indicated β-Lactamase Activity and Level of MIC to β-Lactam Antibiotics.....56
10. Correlation of β-Lactamase Activity and MIC Range, MIC_{50}, MIC_{90} of B. fragilis Group.....57
11. Transferability Study of Ampicillin Resistance from Bacteroides fragilis Group to E. coli and B. vulgatus.....58
12. Minimum Inhibitory Concentration and β-Lactamase Properties of the Donors, Recipient, and Transconjugants.....59
13. The Isoelectric Point of β-Lactamases from B. fragilis Group.....60

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Microscopic morphology of B. fragilis.....61
2. The polymerization reaction of polyacrylamide.....62
3. Structure of chromogenic cephalosporin before and after enzymatic hydrolysis.....63
4. The color of nitrocefin after incubated with enzyme.....64
5. The method of bacterial conjugation.....65
6. Diagram of the cassette for casting polyacrylamide gels.....66
7. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA.....67
8. The isoelectric focusing study of β-lactamases from B. fragilis group.....68

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

β	=	Beta
°C	=	degree celcius
ca	=	circa
cm.	=	centimetre
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
ed.	=	editor
EDTA	=	Ethylenediaminetetra-acetic acid
e.g.	=	exempli gratia
et al.	=	et alii
Fig.	=	Figure
gm.	=	gramme
mg.	=	milligramme
µg.	=	microgramme
kb	=	kilobase
lbs	=	pounds
M	=	Molar
MIC	=	Minimum Inhibitory Concentration
ml.	=	millilitre
µl.	=	microlitre
mm.	=	millimetre
µm	=	micrometre
M.W.	=	Molecular weight
N	=	Normal
pI	=	isoelectric point
Ref.	=	Reference
RNA	=	Ribonucleic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

rpm. = revolutions per minute

T = transconjugant

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OBJECTIVES

1. To study the incidence of β-lactamase production in Bacteroides fragilis group.
2. To determine the minimum inhibitory concentration of ampicillin, penicillin G and cefoxitin for B. fragilis group.
3. To study whether the β-lactamase production in B. fragilis group is plasmid mediated.
4. To determine the isoelectric point of β-lactamase enzymes from B. fragilis group.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย