

**MUTATIONAL ANALYSIS OF QUINOLONE RESISTANCE IN
CAMPYLOBACTER AND SALMONELLA ISOLATED FROM
DIARRHEAL PATIENTS IN THAILAND**

JATUPORN PLEUMSUD

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MEDICAL TECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-6785-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาการดื้อยา QUINOLONE โดยการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมในเชื้อแบคทีเรีย CAMPYLOBACTER และ SALMONELLA ที่แยกได้จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงในประเทศไทย
(MUTATIONAL ANALYSIS OF QUINOLONE RESISTANCE IN CAMPYLOBACTER AND SALMONELLA ISOLATED FROM DIARRHEAL PATIENTS IN THAILAND)

จดุพร ปถิมสุต 4636136 MTMT/M

วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : กนกวรรณ กิตตินิยม, Ph.D., วิจิตร วงศ์ล้ำชา, Ph.D., บุญช่วย เอี่ยมโกลลาภ, M.Sc.

บทคัดย่อ

การดื้อยาในกลุ่มควิโนโลนมีการเพิ่มขึ้นและเป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอุจจาระร่วง เช่น *Campylobacter* และ *Salmonella* โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยเด็กและนักท่องเที่ยวที่กลับจากประเทศไทย กลไกการดื้อยาในกลุ่มควิโนโลน ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์เป้าหมายของยา คือ DNA gyrase และ Topoisomerase IV โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมของยีนบริเวณ QRDR ซึ่งเป็นบริเวณจำเพาะในการจับของยา มักพบการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น ยีน *gyrA* และ ยีน *parC* การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมของยีน *gyrA* และ ยีน *parC* ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาควิโนโลน โดยทำการสำรวจหาการเปลี่ยนแปลงของยีนเหล่านี้ใน *Campylobacter jejuni* จำนวน 111 สายพันธุ์ และ *Salmonella* spp. จำนวน 113 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงในประเทศไทย โดยวิธี Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ชนิดไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสีและวิธีการสังเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งพบว่าใน *Campylobacter* แสดงผล SSCP เป็น 5 รูปแบบแตกต่างกัน โดยเกิดจากการผสมของนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันที่พบในบริเวณ QRDR ของยีน *Campylobacter gyrA* การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน threonine เป็น isoleucine (ACA เป็น ATA) ที่ตำแหน่ง 86 พบในเชื้อ *Campylobacter* ทุกๆตัวที่ดื้อต่อยา nalidixic acid และ ยา ciprofloxacin นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ชนิดไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยน คือ His-81 (CAC to CAT), Gly-110 (GGC to GGT), Ser-119 (AGT to AGC) และ Ala-120 (GCC to GCT) ซึ่งไม่แสดงความจำเพาะต่อรูปแบบความไวต่อยาในกลุ่มควิโนโลน เป็นที่น่าสนใจว่า เชื้อ *Salmonella* ทุกตัวที่ดื้อต่อยา nalidixic acid จะพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 1 ตำแหน่งบริเวณ QRDR ของยีน *Salmonella gyrA* ซึ่งอาจพบการเปลี่ยน serine เป็น phenylalanine หรือ tyrosine ตำแหน่ง 83 หรือ เปลี่ยนจาก aspartic acid เป็น glycine ตำแหน่ง 87 ส่วนยีน *Salmonella parC* พบว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียง 1 ชนิด นอกบริเวณ QRDR คือ Thr-57-Ser (ACC to AGC) และพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ชนิดไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนอีก 8 ชนิด โดยพบทั้งในเชื้อ *Salmonella* ที่ดื้อและไม่ดื้อต่อยา nalidixic acid การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ชนิดที่เปลี่ยนกรดอะมิโนในบริเวณ QRDR ของยีน *gyrA* แสดงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับรูปแบบความไวต่อยาในกลุ่มควิโนโลนของเชื้อ *Campylobacter* และ *Salmonella* ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่จำเพาะนี้อาจนำมาพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้การดื้อยาในกลุ่มควิโนโลนเพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัย รักษา ติดตาม ป้องกันการเกิดโรคและการดื้อยาต่อไป.

96 หน้า . ISBN 974-04-6785-7

MUTATIONAL ANALYSIS OF QUINOLONE RESISTANCE IN
CAMPYLOBACTER AND SALMONELLA ISOLATED FROM DIARRHEAL
PATIENTS IN THAILAND.

JATUPORN PLEUMSUD 4636136 MTMT/M

M.Sc. (MEDICAL TECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: KANOKWAN KITTINIYOM, Ph.D., WIJIT
WONGLUMSOM, Ph.D., BOONCHUAY EAMPOKALAP, M.Sc.

ABSTRACT

Increasing resistance to quinolone is becoming an important problem in treatment of bacteria causing diarrhea such as *Campylobacter* and *Salmonella*, especially in pediatric patients and travelers returning from Thailand. The common mechanism of quinolone resistance is alteration of quinolone target enzymes, DNA gyrase and Topoisomerase IV, via mutation at the quinolone resistance determining region (QRDR) mostly in *gyrA* and *parC* genes. To study mutations of *gyrA* and *parC* genes correlated with quinolone resistance, 111 *Campylobacter jejuni* isolates and 113 *Salmonella* isolates from diarrheal patients in Thailand were examined by using nonradioisotopic Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. The combinations of nucleotide changes within the QRDR of the *Campylobacter gyrA* resulted in 5 different SSCP patterns. Thr-86-Ile (ACA to ATA) mutation was detected in all nalidixic acid/ciprofloxacin resistant strains of *Campylobacter*. The silent mutations at amino acids His-81 (CAC to CAT), Gly-110 (GGC to GGT), Ser-119 (AGT to AGC) and Ala-120 (GCC to GCT) were found additionally with no specific quinolone susceptibility pattern. Interestingly, all nalidixic acid resistant strains of *Salmonella* contained a single mutation in QRDR of *gyrA* with either Ser83Phe (TCC to TTC), Ser83Tyr (TTC to TAC) or Asp87Gly (GAC to GGC) substitutions. However, the only one missense mutation at Thr-57-Ser (ACC to AGC) detected outside the QRDR and eight additional silent mutations were observed in *Salmonella parC* of both nalidixic acid resistant and susceptible strains of *Salmonella*. The specific *gyrA* missense mutations within the QRDR showed a significant correlation with quinolone susceptibility patterns in *Campylobacter* and *Salmonella* and may be developed as potential markers for quinolone resistance detection, for the benefit of better diagnosis, treatment, monitoring and prevention of diseases and antimicrobial resistance.

KEY WORDS: QUINOLONE RESISTANCE/ NALIDIXIC ACID/
CIPROFLOXACIN/ CAMPYLOBACTER/ SALMONELLA/
SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISMS (SSCP)/
gyrA MUTATION/ *parC* MUTATION.

96 P. ISBN 974-04-6785-7