



**CLONING AND CHARACTERIZATION OF TRIMETHOPRIM  
RESISTANCE DETERMINANTS IN CLINICAL ISOLATES OF  
METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI**

**AKRADECH URUPONGSA**

อธิปัทนการ  
จาก  
.....บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.....

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

**2002**

**ISBN 974-04-2081-8**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH  
A315C  
2002  
C.2

4037129 SIMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLOGY)

KEY WORDS : STAPHYLOCOCCI / TRANSPOSON / *dfrA*

AKRADECH URUPONGSA: CLONING AND CHARACTERIZATION OF TRIMETHOPRIM RESISTANCE DETERMINANTS IN CLINICAL ISOLATES OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI. THESIS ADVISOR : AMORNRUT LEELAPORN, Ph.D., VANCHIT GHERUNPONG, M.D., SUNEE KORBSRISATE, Ph.D., 96 p. ISBN 974-04-2081-8

Staphylococci, especially methicillin-resistant strains, are among the most important bacterial pathogens. Both methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) are usually resistant to a wide variety of antimicrobial agents including trimethoprim (Tp). The known genes encoding a high level of resistance to Tp ( $Tp^r_H$ ) are *dfrA* gene located on transposon-like structure Tn4003 located on plasmid, *dfrA* gene on transposon structure located on chromosome and *dfrD* gene.

This study was aimed at the investigation of determinant(s) other than transposon-like structure Tn4003 and *dfrD* gene encoding  $Tp^r_H$  in MRSA and MRCNS isolated from patients in Siriraj Hospital. To obtain the isolates that did not contain transposon-like structure Tn4003 and *dfrD* gene, polymerase chain reaction was used to detect those determinants in  $Tp^r_H$  *S. aureus* (40 isolates) and CNS (47 isolates). Up to 73 of 87 (87.8%) isolates were found to be PCR negative. The DNA from four representative isolates of these (MRCNS378, MRCNS455, MRSA267 and MRSA372) was cloned into *Escherichia coli* vector, pUC18, and transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . *E. coli* clones containing staphylococcal  $Tp^r_H$  determinant were obtained from an experiment using DNA from MRCNS378 and MRCNS455 only. Clones generated from an experiment using DNA from MRSA372 carried *dfrB* gene. AAL1 and AAL2 clones contained an inserted *EcoRI* DNA fragment of approximately 1.3 kb and 3.3 kb in size, respectively, and were derived from MRCNS378 whereas AAL3 (1.3 kb) was from MRCNS455. These *E. coli* clones also exhibited  $Tp^r_H$ . From DNA sequence analyses of inserted DNA from AAL1, AAL2 and AAL3, it was shown that the sequences from AAL1 and AAL3 were identical and contained 3'-end of *thyF*, *dfrsi/dfrA* and *ofr3si*. Furthermore, these sequences were identical to part of that of inserted DNA from AAL2 except 29 bp at the end of a small fragment. DNA hybridization and PCR techniques were carried out to indicate that both MRCNS378 and MRCNS455 contained two copies of  $Tp^r_H$  determinant carrying *dfrA* gene. The determinant was found to be different from those that have been reported.

4037129 SIMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา ; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

อักษรเลข อรุพงศ์ : การทำโคลนนิ่งและศึกษาลักษณะของหน่วยพันธุกรรมที่ควบคุมการคือต่อไตรเมโทพริมในสแตฟีโลคอคไคสายพันธุ์ที่คือต่อเมธิซิลลินที่แยกได้จากผู้ป่วย (CLONING AND CHARACTERIZATION OF TRIMETHOPRIM RESISTANCE DETERMINANTS IN CLINICAL ISOLATES OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อมรรัตน์ ธีลาภรณ์, Ph.D., หวานจิตต์ เกร็นพงษ์, M.D., สุณีย์ กอปรศรีเศรษฐ์, Ph.D., 96 หน้า ISBN 974-04-2081-8

สแตฟีโลคอคไคเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่คือต่อเมธิซิลลิน ทั้ง *Staphylococcus aureus* ที่คือต่อเมธิซิลลิน (MRSA) และ coagulase-negative staphylococci ที่คือต่อเมธิซิลลิน (MRCNS) จะคือต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิดรวมถึงไตรเมโทพริม ยีนที่ควบคุมการคือต่อไตรเมโทพริมในระดับสูงคือยีน *dfrA* บน transposon-like structure Tn4003 ซึ่งอยู่บนพลาสมิด, ยีน *dfrA* บน transposon structure ซึ่งอยู่บนโครโมโซมและยีน *dfrD*

จุดมุ่งหมายของการศึกษาคั้งนี้คือ หาหน่วยพันธุกรรมที่ควบคุมการคือต่อไตรเมโทพริมในระดับสูงใน MRSA และ MRCNS ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราชที่นอกเหนือจาก transposon-like structure Tn4003 และยีน *dfrD* การตรวจหา transposon-like structure Tn4003 และยีน *dfrD* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (40 สายพันธุ์) และ coagulase-negative staphylococci (47 สายพันธุ์) ที่คือต่อไตรเมโทพริมในระดับสูงพบว่า 73 จาก 87 สายพันธุ์ (ร้อยละ 87.8) ไม่พบ transposon-like structure Tn4003 และยีน *dfrD* คีเอ็นเอจาก 4 สายพันธุ์ (MRCNS 378, MRCNS455, MRSA267 และ MRSA372) ที่เป็นตัวแทนของสายพันธุ์เหล่านี้ใช้ในการโคลนเข้าไปใน *E. coli* vector, pUC18 และนำเข้าสู่ *E. coli* DH5 $\alpha$  โคลนของ *E. coli* ที่คือต่อไตรเมโทพริมในระดับสูงมาจากคีเอ็นเอของ MRCNS378 และ MRCNS455 โคลนที่ได้จากคีเอ็นเอของ MRSA372 มียีน *dfrB* โคลน AAL1 และ AAL2 มาจาก MRCNS378 มีชิ้นส่วนคีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบสและ 3.3 กิโลเบสตามลำดับ ขณะที่โคลน AAL3 มาจาก MRCNS455 มีชิ้นส่วนคีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบส โคลน AAL1, AAL2 และ AAL3 คือต่อไตรเมโทพริมในระดับสูง จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนคีเอ็นเอจาก AAL1, AAL2 และ AAL3 แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AAL1 และ AAL3 เหมือนกัน โดยมียีน *thyE*, *dfrsI/dfrA* และ *orfSI* นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ยังเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์จาก AAL2 ยกเว้นส่วนปลายของชิ้นส่วนคีเอ็นเอของ AAL1/AAL3 จำนวน 29 คู่เบส คีเอ็นเอ hybridization และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นตัวบ่งชี้ว่าทั้ง MRCNS378 และ MRCNS455 มีหน่วยพันธุกรรมที่มี *dfrA* ควบคุมการคือต่อไตรเมโทพริมในระดับสูงจำนวน 2 ชุด หน่วยพันธุกรรมที่พบนี้แตกต่างจากที่อื่นที่มีการรายงานมา