

- 6 AUG 2002



**MOLECULAR ANALYSIS OF CHLORAMPHENICOL
RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCI**

UBONWAN JOTEKRATOK

ว

อุภินันท์นาการ

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

2002

ISBN 974-04-1868-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
U15m
2002
C.2

4037617/SIIM/M : MAJOR: IMMUNOLOGY; M.Sc. (IMMUNOLOGY)
 KEY WORDS : CHLORAMPHENICOL / RESISTANCE / STAPHYLOCOCCI
 UBONWAN JOTEKRATOK: MOLECULAR ANALYSIS OF
 CHLORAMPHENICOL RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCI. THESIS ADVISORS:
 SA-NGA PATTANAKITSAKUL, D.Med.Sc., AMORNROT LEELAPORN, Ph.D.,
 THERDSAK PRAMMANANAN, Dr.rer.biol.hum., 92 P, ISBN 974-04-1868-6

Staphylococci are among the most important bacterial pathogens. *S. aureus* is a major cause of both nosocomial and community-acquired infections. Coagulase-negative staphylococci (CNS) are important nosocomial pathogens causing infections of prosthetic implants and devices. Antimicrobial resistance is an important problem for the therapy of staphylococcal infections. Staphylococci, especially methicillin-resistant staphylococci (MRS) are resistant to most antimicrobial agents, including chloramphenicol.

Chloramphenicol is a broad-spectrum antibiotic that causes a bacteriostatic effect by binding to 50s subunit of ribosomal RNA and it inhibits the elongation of protein synthesis. The most important mechanism of chloramphenicol resistance in staphylococci involved chloramphenicol acetyltransferase (CAT), which acetylated the 3-hydroxy group of chloramphenicol, so the acetylated chloramphenicol cannot bind to the target site. The CAT enzymes are encoded by *cat* genes on plasmids. The staphylococcal *cat*-encoded plasmids can be divided into 3 groups, based on sequence homology: pC221, pC223 and pC194 groups.

In this study, A total of 149 clinical staphylococcal isolates, which were divided into 4 groups based on methicillin susceptibility, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) and methicillin-sensitive coagulase-negative staphylococci (MSCNS) were studied. All of the 149 staphylococcal isolates exhibited the chloramphenicol minimum inhibitory concentration (MIC), between 16-128 µg/ml. These staphylococcal isolates were resistant to chloramphenicol, according to the recommendation of NCCLS.

The *cat* genes of all 149 staphylococcal isolates were detected by multiplex PCR. The pC221-related *cat* gene was observed in 2.9%, 80%, 70% and 25% of MRSA, MRCNS, MSSA and MSCNS, respectively, whereas pC223-related *cat* gene was found in 20%, 30% and 75% of MRCNS, MSSA and MSCNS, respectively. Surprisingly, the pC223-related *cat* gene was not found in MRSA, whereas the pC194-related *cat* gene was solely observed in MRSA, with a frequency of 95.6%. However, there is one isolate of MRSA (MRSA505) in which the *cat* gene could not be detected by PCR. The unique distribution of *cat*-specific plasmid suggests a pattern of transmission of genetic material between specific groups of bacteria that may relate to the drug resistance in some bacterial isolates.

The location of the *cat* gene of 20 random isolates of each *cat*-encoded plasmid groups were studied by Southern blot hybridization. The *cat* genes of each *cat*-encoded plasmid group were observed only on plasmids. This indicated the potential of the staphylococcal *cat* gene in the spread of itself among staphylococcal isolates via mechanisms of gene transfer.

4037617 SIIM/M : สาขาวิชา: วิทยาภูมิคุ้มกัน; วท.ม. (วิทยาภูมิคุ้มกัน)

อุบลวรรณ โจทย์กระโทก: การศึกษาในระดับโมเลกุลของแบคทีเรียกลุ่ม staphylococci ต่อการดื้อยาคลอแรมเฟนิคอล (MOLECULAR ANALYSIS OF CHLORAMPHENICOL RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCI)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สง่า พัฒนากิจสกุล, D.Med.Sc., อมรรัตน์ ลีลาภรณ์, Ph.D., เทอดศักดิ์ พรหมณะ
นันท์, Dr.rer.biol.hum. 92 หน้า, ISBN 974-04-1868-6

สแตฟีโลคอคโคเป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางการแพทย์ *Staphylococcus aureus* เป็นสาเหตุของการติดเชื้อที่พบได้บ่อยทั้ง nosocomial และ community-acquired infections ส่วน *Staphylococcus spp.* อื่นๆ ซึ่งรวมเรียกว่า coagulase-negative staphylococci (CNS) เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีการสอดใส่เครื่องมือแพทย์ต่างๆ การดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียเป็นปัญหาสำคัญในการรักษาการติดเชื้อจากสแตฟีโลคอคโค โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเมธิซิลลิน สายพันธุ์เหล่านี้ดื้อต่อยาต้านจุลชีพเกือบทุกชนิดรวมทั้งยาคลอแรมเฟนิคอล

คลอแรมเฟนิคอลเป็นยาต้านจุลชีพที่สามารถรักษาได้ทั้งเชื้อที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยจับกับ 50S subunit ของ ribosomal RNA และยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มความยาวของสาย peptide ในกระบวนการสร้างโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย กลไกที่สำคัญของการดื้อยาคลอแรมเฟนิคอลของเชื้อสแตฟีโลคอคโคคือเชื้อดื้อยาจะสร้างเอนไซม์ chloramphenicol acetyltransferase (CAT) ซึ่งทำหน้าที่เติมหมู่ acetyl ที่หมู่ hydroxy ตำแหน่งที่ 3 ของโมเลกุลของยาคลอแรมเฟนิคอล ทำให้ยาคลอแรมเฟนิคอลไม่สามารถจับกับตำแหน่งที่ออกฤทธิ์ได้ เอนไซม์ CAT ถูกสังเคราะห์จากยีน *cat* ที่อยู่บน พลาสมิด พลาสมิดของเชื้อสแตฟีโลคอคโคที่มียีน *cat* สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์คือ กลุ่มพลาสมิด pC221, กลุ่มพลาสมิด pC223 และ กลุ่มพลาสมิด pC194

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเชื้อสแตฟีโลคอคโคที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้และดื้อต่อยาคลอแรมเฟนิคอลเป็นจำนวนทั้งสิ้น 149 สายพันธุ์ สายพันธุ์เหล่านี้แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มตามระดับความไวต่อยาเมธิซิลลิน คือ *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาเมธิซิลลิน (MRSA และ MSSA) coagulase-negative staphylococci สายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาเมธิซิลลิน (MRCNS และ MSCNS) เชื้อทั้งหมด 149 สายพันธุ์มีค่าระดับความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) อยู่ระหว่าง 16 ถึง 128 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร เชื้อเหล่านี้จัดว่าเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาคลอแรมเฟนิคอลตามหลักเกณฑ์คำแนะนำของ National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)

จากการตรวจหายีน *cat* ในเชื้อทั้งหมด 149 สายพันธุ์โดยวิธี multiplex PCR พบยีน *cat* ที่อยู่ในกลุ่มพลาสมิด pC221 ร้อยละ 2.9, 80, 70 และ 25 ในเชื้อ MRSA, MRCNS, MSSA และ MSCNS ตามลำดับ และพบยีน *cat* ที่อยู่ในกลุ่มพลาสมิด pC223 ร้อยละ 20, 30 และ 75 ในเชื้อ MRCNS, MSSA และ MSCNS ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบเชื้อ MRSA 1 สายพันธุ์ (MRSA 505) ที่ไม่สามารถตรวจพบยีน *cat* ได้โดยวิธี PCR สิ่งที่น่าสนใจคือไม่พบยีน *cat* ที่อยู่ในกลุ่มพลาสมิด pC223 ในเชื้อ MRSA แต่พบยีน *cat* ที่อยู่ในกลุ่มพลาสมิด pC194 ร้อยละ 95.6 ในเชื้อ MRSA ผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงการแพร่กระจายของยีน *cat* อย่างเด่นชัดและสัมพันธ์กับพลาสมิดซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดของยีนระหว่างกลุ่มที่จำเพาะของแบคทีเรียและเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในแบคทีเรียบางสายพันธุ์

การศึกษาตำแหน่งของยีน *cat* โดยการทำ Southern blot hybridization จากตัวอย่างเชื้อที่สุ่มเลือกมาประมาณ 20 สายพันธุ์ของแต่ละกลุ่มของพลาสมิด พบว่ายีน *cat* มีตำแหน่งอยู่บนเฉพาะพลาสมิด ผลที่ได้บ่งชี้ถึงกลไกของยีน *cat* ในการถ่ายทอดตัวมันเองระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อสแตฟีโลคอคโคด้วยกระบวนการการถ่ายทอดของยีน