

การวิเคราะห์ลำดับของยีน *gyrA* และ *parC* ในเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อ  
ciprofloxacin จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม



นางสาว สุภาวดี ณ ป้อมเพ็ชร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

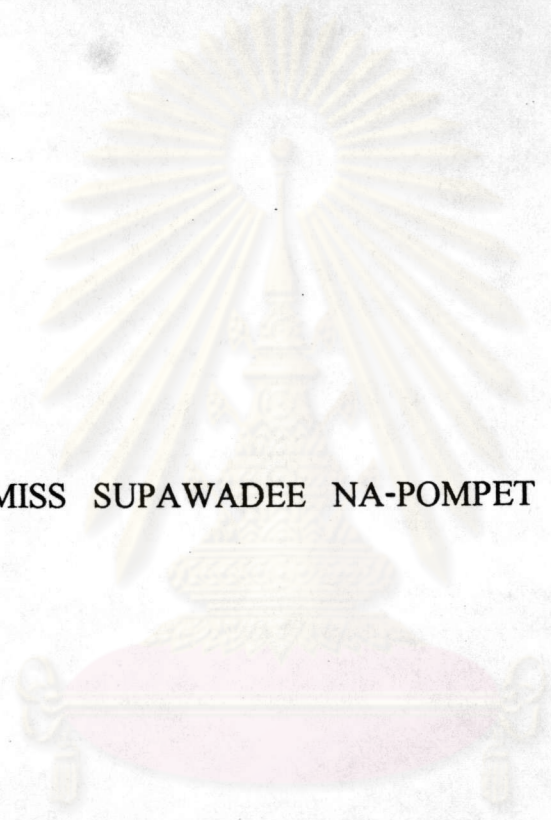
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0278-7

- 7 ก.พ. 2550

I902ม9196

SEQUENCE ANALYSIS OF *gyrA* AND *parC* HOMOLOGUES OF  
*Vibrio parahaemolyticus* CIPROFLOXACIN RESISTANT MUTANTS  
FROM PATIENTS AND ENVIROMENT



MISS SUPAWADEE NA-POMPET

A Thesis Submitted in Partial fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0278-7

Thesis title            Sequence Analysis of *gyrA* and *parC* Homologues of  
*Vibrio parahaemolyticus* Ciprofloxacin Resistant Mutants  
From Patients and Environment

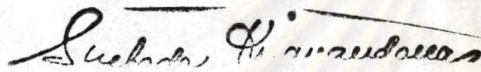
By                        Miss Supawadee Na-pompet

Field of Study        Medical Microbiology

Thesis adviser        Anan Chongthaleong, M.D.

---

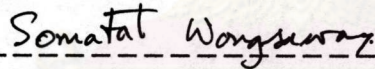
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial  
fulfillment of the requirements for the Master's degree



-----  
Dean of Graduate School

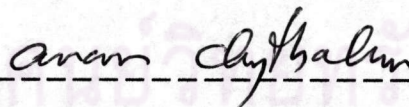
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

Thesis committee



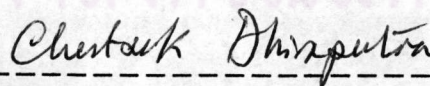
-----  
Chairman

(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr.med.vet.)



-----  
Thesis Advisor

(Anan Chongthaleong, M.D.)



-----  
Member

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

## บทคัดย่อวิทยานิพนธ์

สุภาวดี ณ ป้อมเพ็ชร : การวิเคราะห์ลำดับของยีน *gyrA* และ *parC* ในเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา ciprofloxacin จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม (SEQUENCE ANALYSIS OF *GYRA* AND *PARC* HOMOLOGUES OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CIPROFLOXACIN RESISTANT MUTANTS FROM PATIENTS AND ENVIROMENT. อาจารย์ที่ปรึกษา : นายแพทย์ อนันต์ จงเถลิง 127 หน้า. ISBN 974-17-0278-7.

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงที่พบได้บ่อยโดยการรับประทานอาหารทะเล และบางครั้งต้องการการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ มีรายงานการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน *gyrA* และ *parC* ในจุลชีพนี้ที่เกิดขึ้นโดยการเหนี่ยวนำในห้องปฏิบัติการ แต่ยังไม่มียารายงานในจุลชีพนี้ที่แยกได้จากธรรมชาติ

ในการศึกษานี้สามารถแยกเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* จากแหล่งธรรมชาติในจังหวัดชลบุรี และจังหวัดสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ 2543 ได้จำนวน 70 ตัวอย่าง หลังจากทำการทดสอบความไวรับต่อยา ciprofloxacin พบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่มีค่า MIC  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$  จำนวน 21 ตัวอย่าง ประกอบด้วยจุลชีพที่แยกได้จากดินตะกอนในบ่อกุ้ง 15 ตัวอย่าง และจุลชีพที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้ง 6 ตัวอย่าง พบเชื้อที่มีค่า MIC สูงสุดเท่ากับ  $8 \mu\text{g/ml}$  โดยเป็นตัวอย่างที่แยกได้จากกุ้งในจังหวัดชลบุรี หลังจากนั้นมาตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยวิธี DNA sequencing พบว่า เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ทั้ง 21 ตัวอย่าง มีการดื้อยาที่ตำแหน่ง Quinolone Resistant Determining Region- QRDR ของยีน *gyrA* และ *parC* โดยพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในยีน *gyrA* ที่ตำแหน่ง 83 ในเชื้อ 19 ตัวอย่าง โดยกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Serine เป็น Leucine รวมถึงพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในยีน *parC* ในเชื้อ 20 ตัวอย่าง ที่ตำแหน่ง 85 โดยกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Serine เป็น Phenylalanine อย่างไรก็ตาม ช่วงของค่า MIC ที่ทำให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรมในยีน *parC* ในเชื้อที่พบจากธรรมชาติไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Okuda และคณะที่ทดลองในเชื้อที่เหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาในห้องปฏิบัติการ

ภาควิชา... สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์... ลายมือชื่อนิสิต..... สุภาวดี ณ ป้อมเพ็ชร

สาขาวิชา... จุลชีววิทยาทางการแพทย์... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา... anan. chitling

ปีการศึกษา... 2544

## AN ABSTRACT

## 4175270730 : MAJOR: MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD : *Vibrio parahaemolyticus* / FLUOROQUINOLONE RESISTANT /  
CIPROFLOXACIN / *gyrA* / *parC*

SUPAWADEE NA-POMPET: THESIS TITLE : SEQUENCE ANALYSIS OF *GYRA*  
AND *PARC* HOMOLOGUES OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* CIPROFLOXACIN  
RESISTANT MUTANTS FROM PATIENTS AND ENVIROMENT. THESIS  
ADVISER : ANAN CHONGTHALEONG M.D. 127 pp. ISBN 974-17-0278-7.

*Vibrio parahaemolyticus* is a marine bacteria which can cause gastroenteritis through seafood consumption with antimicrobial therapy is needed in some cases. Seventy isolates of *Vibrio parahaemolyticus* from several aquatic sources were obtained from Chonburi and Suratthani province in March 2000. Antimicrobial susceptibility test to ciprofloxacin has revealed 21 environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates, which have MIC  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , consisting of 15 sediment isolates and 6 shrimp isolates with the highest MIC values 8  $\mu\text{g/ml}$  of shrimp isolate from Chonburi province. Nucleotide sequence analysis in *gyrA* and *parC* QRDR have showed the mutations in *gyrA* of 19 isolates at codon 83 resulting in amino acid substitution from Ser to Leu. The mutations in *parC* were found in 20 isolates at codon 85 resulting in amino acid substitution from Ser to Phe. However, the MIC range which have caused the mutations in *parC* found in *Vibrio parahaemolyticus* from natural sources were not corresponded to previous study by Okuda et al. which have done in laboratory-induced ciprofloxacin resistant *Vibrio parahaemolyticus*.

Department... Medical microbiology..... Student's signature... *Supanadee Na-pompot*  
Field of study Medical microbiology..... Advisor's signature... *Anan Chongthaleong*  
Academic year.... 2001

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible:

Anan Chongthaleong M.D., Department of microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for his kindness and indispensable help in supervising this thesis.

Associate Professor Somathat Wongsawang, Dr.med.vet., the chairman of thesis committee, Department of microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, and Associate Professor Chertsak Dhiraputra, M.D., M.Sc., the member of thesis committee for their constructive criticisms.

Special thanks go to Natthiya Pimthanothai, M.D., Ph.D., for her kindness and indispensable help in supervising and equipments.

Graduate School and Research Affair, Chulalongkorn University, for research assistant grant.

Sincere thanks go to the staffs of the Department of Microbiology and the fellow students for providing facilities and encouragement.

Finally, I am deeply indebted to my parents, sister, brother and my dogs for their love, concern, help encouragement and understanding.

## CONTENTS

	page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	iv
ABBRIATIONS.....	xi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
II OBJECTIVES.....	4
III LITERATURE REVIEW.....	5
IV METERIAL AND METHODS.....	39
V RESULTS.....	56
VI DISCUSSION.....	77
VII CONCLUSION.....	81
REFERENCES.....	82
APPENDICES.....	108
APPENDIX I.....	109
APPENDIX II.....	112
BIOGRAPHY.....	115

## LIST OF TABLE

Table	page
1 : Diseases caused by pathogenic <i>Vibrio</i> species.	7
2 : Some major characteristics of the families <i>Enterobacteraceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> , and <i>Pseudomonaceae</i> .	8
3 : Characteristics generally useful in differentiating the pathogenic <i>Vibrio</i> species from pathogenic <i>Aeromonas</i> and <i>Plesiomonas</i> .	9
4 : Differentiation of arginine dihydrolase-negative, lysine decarboxylase-positive <i>Vibrio</i> species	19
5 : Characteristics of the 70 isolates of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> identified.	57
6 : MIC of 70 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolates	62
7 : MIC <sub>90</sub> and MIC <sub>50</sub> of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolates from different sources.	68
8 : Mutations detected in <i>gyrA</i> and <i>parC</i> sequences of spontaneous CIP- resistant mutants of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolates	73



## LISTS OF FIGURES

Figure	page
1 : Major activities of DNA gyrase and topoisomerase IV.	21
2 : The proposed quinolone-DNA cooperative binding model for DNA gyrase inhibition.	31
3 : Functional domains of quinolone antibacterial agent.	32
4 : MIC distribution of 70 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolates	63
5 : MIC distribution of 48 Environmental isolates	64
6 : MIC distribution of 34 sediment isolates	65
7 : MIC distribution of 14 shrimp isolates	66
8 : MIC distribution of 22 clinical isolates	67
9 : Agarose gel electrophoresis of specific 285-bp amplicons.	70
10 : Agarose electrophoresis showed amplicons of 200 and 214 bp for <i>gyrA</i> QRDR and the <i>parC</i> QRDR	72
11 : The chromatogram obtained from automate sequencing showed differentiation between nucleotide sequences within <i>gyrA</i> QRDR of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 and a ciprofloxacin resistant mutant at the codon 83 (AGT→ ATT).	74
12 : The chromatogram obtained from automate sequencing compare a differentiation between nucleotide sequences within <i>parC</i> QRDR of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 (TCT→TTT) and ciprofloxacin resistant mutant	75

## LISTS OF FIGURES

Figure	page
13 : The chromatogram obtain from automate sequencing showed silent mutation with in <i>gyrA</i> QRDR of a ciproifoxacin resistant mutant at the codon 79 comparing with <i>Vibrio parahemolyticus</i> ATCC 17802 (CCA→ CCG).	76

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABREVIATION

Asn	Asparagine
Asp	Aspartic acid
bp	base pair
dATP	Deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	Deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine 5'-phosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dTTP	Deoxythymidine 5'-phosphate
Glu	Glutamic
Gyr A	Gyrase subunit A
GyrB	Gyrase subunit B
<i>gyrA</i>	Gyrase A gene
<i>gyrB</i>	Gyrase B gene
h	Hour
His	Histidine
KP	Kanagawa phenomenon
Leu	Leucine
Lys	Lysine
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
min	Minute
mm	Millimeter
<i>parC</i>	Topoisomerase IV C gene

<i>parE</i>	Topoisomerase IV E gene
ParC	Topoisomerase subunit C
ParE	Topoisomerase subunit E
PCR	Polymerase chain reaction
QRDR	Quinolone resistant determining region
rpm	round per minute
Ser	Serine
TCBS	Thio sulphate-citrate-bile salts-sucrose
TDH	Thermostable direct hemolysin
Try	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
$\mu\text{g}$	Microgram
$\mu\text{l}$	Microlitre
$\mu\text{M}$	Micromole



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย