การดื้อข้ามต่อยาฆ่าเชื้อ Halquinol กับยาปฏิชีวนะใน *E.coli* ที่แยกได้จากสุกร

นายนิศิษฐ จันทร์ทรง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CROSS - RESISTANCE BETWEEN AN ANTISEPTIC HALQUINOL AND ANTIBIOTICS IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM SWINE

Mr. Nisit Chansong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health

Department of Veterinary Public Health

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

510691

Thesis Title	CROSS - RESISTANCE BETWEEN AN ANTISEPTIC HALQUINOL AND ANTIBIOTICS IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM SWINE
By	Mr. Nisit Chansong
Field of Study	Veterinary Public Health
Advisor	Assistant Professor Suthep Ruangwises, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant Professor Rungtip Chuanchuen, D.V.M., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Annop Kunavongkrit ..... Dean of the Faculty of Veterinary Science

(Professor Annop Kunavongkrit, D.V.M., Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Alongkorn Amonsin, D.V.M., Ph.D.)

..... Advisor

(Assistant Professor Suthep Ruangwises, Ph.D.)

..... Co-Advisor

(Assistant Professor Rungtip Chuanchuen, D.V.M., Ph.D.)

..... External Examiner

(Associate Professor Chanpen Wiwat, Ph.D.)

นิศิษฐ จันทร์ทรง : การดื้อข้ามต่อยาฆ่าเชื้อ Halquinol กับยาปฏิชีวนะใน *E.coli* ที่แยกได้จากสุกร. (CROSS - RESISTANCE BETWEEN AN ANTISEPTIC HALQUINOL AND ANTIBIOTICS IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM SWINE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น , 57 หน้า.

Escherichia coli ที่แยกได้จากสุกรจำนวน 355 isolates แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรไม่ได้รับ Halquinol (n=152) และกลุ่มที่ 2 *E. coli* ที่แยกได้จากสุกรที่ได้รับ Halquinol (n= 203) ทดสอบหาค่าความไวต่อ Halquinol และยาปฏิชีวนะ 8 ตัวใน *E. coli* ทุก isolates ศึกษาความเป็นไปได้ของการเกิดการดื้อข้ามระหว่าง Halquinol กับยาปฏิชีวนะใน *E. coli* 2 isolates ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะและมีค่า MIC ต่อ Halquinol ต่ำและ *E. coli* MG1655rif^r ด้วยเทคนิคสำหรับ step-wise exposure experiment ทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดยีนควบคุมการดื้อต่อ Halquinol ใน *E. coli* จากกลุ่มที่ 2 ที่มีค่า MIC ต่อ Halquinol สูงและมี plasmid จำนวน 19 isolates ผลการวิจัยพบว่า โดยส่วนใหญ่ *E. coli* ในกลุ่มที่ 1 มีค่า MIC ระหว่าง 32-64 µg/ml (69.1%) และเชื้อในกลุ่มที่ 2 ส่วนใหญ่มีค่า MIC ระหว่าง 4-64 µg/ml (86.7%) โดยมี *E. coli* จำนวน 11.8% มีค่า MIC สูงที่ 128 µg/ml ค่า MIC_{90} ต่อ Halquinol ของเชื้อ *E. coli* ในกลุ่มที่ 1 และ 2 เท่ากับ 64 และ 128 µg/ml ตามลำดับ อัตราการดื้อต่อยาปฏิชีวนะทุกตัวยกเว้น trimethoprim ของ *E. coli* ในกลุ่มที่ 1 สูงกว่าเชื้อในกลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยส่วนใหญ่ของ *E. coli* ทั้ง 2 กลุ่มดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกัน จัดรูปแบบการดื้อยาปฏิชีวนะได้ 41 รูปแบบ และรูปแบบที่พบมากที่สุด (16%) คือ ampicillin-chloramphenicol-ciprofloxacin-gentamicin-streptomycin-sulfadimethoxazole-tetracycline จากการสัมผัส Halquinol ในระดับ sublethal concentration ไม่มีผลทำให้ *E. coli* มีความไวต่อ Halquinol ลดลงและไม่เกิดการดื้อข้ามยาปฏิชีวนะ ไม่พบการถ่ายทอดการดื้อต่อ Halquinol แบบขวาง

ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2551 ..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

4975588031 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEYWORDS : cross-resistance, antibiotic resistance, Halquinol, *Escherichia coli*

NISIT CHANSONG : CROSS-RESISTANCE BETWEEN AN ANTISEPTIC HALQUINOL AND ANTIBIOTICS IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM SWINE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUTHEP RUANGWISES, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. RUNGTIP CHUANCHUEN, D.V.M, Ph.D., 57 pp.

A total of 355 *Escherichia coli* isolates from swine were comprising of group I, non Halquinol–exposed *E. coli* isolates (*n*= 203) and group II, Halquinol-exposed *E. coli* isolates (*n*=152). All samples were assayed for susceptibility to Halquinol and 8 antibiotics. Two antibiotic-susceptible *E. coli* isolates with low Halquinol MIC and *E. coli* MG1655rif^r were used for Halquinol-exposure experiment. Nineteen of the *E. coli* isolates from group II that exhibited high Halquinol MIC and contained plasmid were assessed for transfer of Haquinol resistance. Most of *E. coli* in group I (69.1%) exhibited Halquinol MIC of 32-64 µg/ml. The *E. coli* isolates in group II formed a large population (86.7%) with Halquinol MIC range 4-64 µg/ml and a frequency peak at MIC of 128 µg/ml (11.8%). The Halquinol MIC_{90} of *E. coli* in group I and II were 64 and 128 µg/ml, respectively. Resistance rates to all antibiotics (except trimethoprim) of *E. coli* in group I were significantly greater than that of *E. coli* in group II ($p<0.05$). Most of the *E. coli* isolates from both groups were multiresistant. Forty-one resistance patterns were defined and the most common resistance pattern (16%) was ampicillin-chloramphenicol-ciprofloxacin-gentamicin-streptomycin-sulfomethoxazole-tetracycline. No spontaneous Halquinol-resistant mutants were obtained and no cross-resistance to antibiotics was observed. Halquinol resistance was not horizontally transferred.

Department : Veterinary Public Health ..... Student's Signature .....

Field of Study : Veterinary Public Health ... Advisor's Signature .....

Academic Year : 2008 ..... Co-Advisor's Signature .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Assistant Professor Dr. Suthep Ruangwises. He has been a constant source of support, and has given me the encouragement I needed to accomplish my goals. I also extend my sincere gratitude to my co-advisor, Assistant Professor Dr. Rungtip Chuanchuen who introduced me to research with her advice and expertise. It was under her direct supervision that the great value work contained in this thesis was performed.

I would like to thank Associate Professor Dr. Alongkorn Amonsin, the chairman of the thesis committee and Associate Professor Dr. Chanpen Wiwat a member of the thesis committee for their constructive criticisms and valuable suggestions.

I am greatly indebted to staff of the Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University especially, Chailai Kuwattananukul for her help and support. I would like to thank my classmate, Wechsiri Wannaprasart and Sirintip Khemtong who provided laboratory training and their personal guidance providing a good basis for my work. They have never tired of answering my questions.

Thank to Assistant Professor Dr. Pawin Padungtod , Faculty of Veterinay Medicine, Chiang Mai University for his help in statistical analysis and the Veterinary Diagnostic Laboratory, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for technical support of the thesis.

I would like to thank Novartis (Thailand) Ltd., Animal Health Business Unit for the grant support until this work has been accomplished. Lastly, I would also like to extend this dedication to my wife and my children, deeply grateful for their true love, for always being there for me and inspiring me to do my best.

CONTENTS

	Page
Thai abstract	iv
English abstract	v
Acknowledgements	vi
Contents	vii
List of Tables	ix
List of Figures	x
List of Abbreviations	xi
Chapters	
I Introduction	1
II Review literatures	5
1. General characteristics and pathogenesis of *E. coli*	5
2. Occurrence and epidemiology of antibiotic resistance in of *E. coli*	8
3. Antibiotics cross-resistance of *E. coli*	13
4. Prudent use of Halquinol in pigs	15
III Materials and methods	20
Phase 1 Susceptibility to Halquinol and antibiotics	22
Phase 2: Cross-resistance between Halquinol and antibiotics in *E. coli*	25
Statistical Analysis	28
IV Results	30
1. Susceptibility to Halquinol and antimicrobial	30
2. Halquinol-spontaneous resistance mutants and cross-resistance to antibiotics	36
3. Test for transferability of Halquinol resistance encoding gene(s)	38
Discussion	41
Conclusion and suggestion	45
References	46

Page

Appendices..... 53

Biography..... 57

LIST OF TABLES

Table		Page
Table 1.	The *E.coli* isolated from rectal swab samples	21
Table 2.	Solvents and concentrations of antibiotics.....	23
Table 3.	Breakpoints of antimicrobials.....	24
Table 4.	The MICs of the *E.coli* strain used in exposure experiment.....	25
Table 5.	The MICs of *E.coli* strain selected for plasmid extraction.....	27
Table 6.	MICs of non Halquinol-exposed and Halquinol-exposed *E. coli*	31
Table 7.	Antibiotic resistance patterns of *E. coli*	33
Table 8.	The MIC_{90} of all antibiotics and Halquinol.....	36
Table 9.	The MICs of the *E. coli* strains pre- and post-Halquinol exposure.....	37
Table 10.	The MICs of the *E. coli* parents and the exposed strains.....	38
Table 11.	Plasmid profiles of *E. coli* strains with high Halquinol MIC.....	39

LIST OF FIGURES

Figure		Page
Figure 1.	*Escherichia coli* (Gram stains).....	6
Figure 2.	Mechanism of antibiotic resistance in bacteria.....	12
Figure 3.	Chemical structure of Halquinol.....	13
Figure 4.	Halquinol molecular structure and its affinity.....	17
Figure 5.	The conceptual framework in this study.....	20
Figure 6.	Biparental mating.....	29
Figure 7.	Frequency of resistance to 8 antibiotics of all the *E. coli* isolates.....	32
Figure 8.	Frequency of resistance to 8 antibiotics of *E. coli* isolates in group I and II.....	35
Figure 9.	rep-PCR profiling of *E. coli* isolates pre-and post exposed to Halquinol.....	37
Figure 10.	Plasmid profiles of *E. coli* isolates with high Halquinol MIC.....	39

LIST OF ABBREVIATIONS

a.i.	active ingredient
AMP	ampicillin
bp	base pair(s)
BPW	Buffered Peptone Water
°C	degree(s) Celcius
CFU	Colony Forming Unit
CHP	chloramphenicol
CIP	ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	deoxyribonucleic acid(s)
DW	distilled water
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
e.g.	exempli gratia, for example
et al.	Et alii, and others
E.	*Escherichia*
g	gram (s)
GEN	gentamicin
HAL	Halquinol
HCl	hydrochloric acid
i.e.	id est, such as
Kg	Kilogram (s)
L	litre
LB	Luria-Bertani medium
log	logarithmic growth phase
M	molar
mg	milligram (s)
$MgCl_2$	magnesium chloride
MIC	minimal inhibitory concentrations

min	minute(s)
ml	milliliter
mM	millimolar
ng	nanogram
No.	number
NSS	normal saline solution
PCR	polymerase chain reaction
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
ppm	part per million
PSD	Peptone Saline Diluting fluid
R, r	resistance/resistant
RIF	rifampicin
rpm	round per minutes
SCAN	Scientific committee on Animal Nutrition
SDS	sodium dodecyl sulfate
STR	streptomycin
SUL	Sulfamethoxazole
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TET	tetracycline
TRI	Trimethoprim
U	unit
µl	microlitter
µg	microgram(s)
µm	micrometer
µM	micromolar
%	percentage