

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF MULTIDRUG RESISTANT PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* HUMAN ISOLATES FROM 2001-2010

SUPAPORN RUKSASIRI 5437663 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHANWIT TRIBUDDHARAT, M.D., Ph.D.,
CHERTSAK DHIRAPUTRA M.D., M.Sc., IYARIT THAIPISUTIKUL, M.D., Ph.D.,
KANOKWAN KITTINIYOM, Ph.D.**ABSTRACT**

Multidrug resistant (MDR) diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) is a dangerous causative agent of diarrhea in children and travelers. Nevertheless, little is known about the molecular characteristics of these bacteria in a community setting. This study assessed the prevalence and molecular characterization of class 1 integrons and epidemiology of 200 MDR diarrheagenic *E. coli*: enteroaggregative *E. coli* (EAEC); enteropathogenic *E. coli* (EPEC); enterotoxigenic *E. coli* (ETEC); enteroinvasive *E. coli* (EIEC); and shiga-like toxin producing *E. coli* (STEC) isolates from indigenous children, native adults and travelers in Thailand, Cambodia, Maldives, Nepal, and Vietnam in 2001-2010. Using PCR specific primers to a class 1 integrase (*intI1*) gene, 5'-3' conserved sequence (5'CS-3'CS), and dot-blot hybridization, class 1 integrons were found in 70.5% (62/88) and 76.4% (84/110) in adults and children, respectively. Resistance gene cassettes identified in this study were *aadA1*, *aadA2*, and *aadA5* (for streptomycin resistance); *dfrA12* and *dfrA17* (for trimethoprim resistance); and *linF* (for lincosamide resistance). Epidemiological study was performed to understand genetic relatedness and investigate the possible clonal spread among these bacteria by using plasmid profiling, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR), and high throughput multi-locus sequence typing (HiMLST) incorporated with space-time disease surveillance. Using Achtman MLST typing scheme, this study have designed the specific PCR primers to 7 housekeeping genes, excepting *adk* to obtain optimal amplicon sizes for 454 sequencing system. Among three typing techniques, plasmid profiling gave the lowest discriminatory power (DI, 0.956) whereas DI of ERIC PCR is very similar to HiMLST (0.973 vs 0.979). The results showed high diversity in each group of *E. coli* pathotypes, whereas ST182 was predominant as the ETEC, suggesting some ETEC strains were clonal expansion. The clonal spread included the possible outbreaks, the persistence clones, and the international spread clones. Moreover, many STs were matched with strains from food-producing animals in *E. coli* MLST database. These findings highlight the role of clonal expansion among these bacteria in human and animals. In conclusion, this study revealed the long-term genetic relatedness among community-acquired MDR diarrheagenic *E. coli* isolates harboring class 1 integrons, and suggested the circulation of these resistance elements in the community. These results provide crucial public health information for surveillance and control of antibiotic resistance pathogens in this part of Asia. A cost-effective high-throughput MLST (HiMLST) absolutely generates the robust MLST on a large-scale sequencing, which can be applied for new strategies in MLST studies using next-generation sequencing (NGS) or new affordable applications.

KEY WORDS: *ESCHERICHIA COLI*/ INTEGRON/ HIGH THROUGHPUT
MULTI-LOCUS SEQUENCE TYPING/ CLONAL SPREAD/
NEXT-GENERATION SEQUENCING

140 pages

การตรวจระดับอนุชีวโมเลกุลและการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *Escherichia coli* ชนิดก่อโรคที่ติดต่อทางด้านจุลชีพหลายขนานจากคนในช่วงปี 2001-2010

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF MULTIDRUG RESISTANT PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* HUMAN ISOLATES FROM 2001-2010

สุภาพร รักษาสิริ 5437663 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, M.D., Ph.D., เชิดศักดิ์ ชีระบุตร, M.D., M.Sc., ไอยฤทธิ ไทยพิสุทธิกุล, M.D., Ph.D., กนกวรรณ กิตตินิยม, Ph.D.

บทคัดย่อ

เชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) ชนิดก่อโรคท้องเสียที่ก่อหลายขนานเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็กและนักท่องเที่ยว อย่างไรก็ตามข้อมูลด้านลักษณะทางอนุชีวโมเลกุลของเชื้อเหล่านี้ในชุมชนยังมีน้อย การศึกษารุ่นนี้ได้ประเมินความชุกและลักษณะทางอนุชีวโมเลกุลของ class 1 integrons และระบาดวิทยาของเชื้อ *E. coli* ชนิดก่อโรคท้องเสียที่ก่อหลายขนาน จำนวน 200 ตัวอย่างที่แยกได้จากเด็กชนพื้นเมืองและผู้ใหญ่รวมทั้งชาวบ้านและนักท่องเที่ยวในประเทศไทย กัมพูชา มัลดีฟส์ เนปาล และเวียดนามช่วงปี ค.ศ. 2001-2010 ซึ่งได้แก่ enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ shiga-like toxin producing *E. coli* (STEC) โดยวิธีเพิ่มสารพันธุกรรมแบบลูกโซ่ (PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่ออิน *intI1*, 5'CS-3'CS และวิธี dot-blot hybridization โดยอินเป้าหมายคือ *intI1* ตรวจพบ class 1 integrons 70.5% (62/88) และ 76.4% (84/110) ในผู้ใหญ่และเด็กตามลำดับ ยีนดื้อยาที่พบในการศึกษารุ่นนี้ได้แก่ *aadA1*, *aadA2* และ *aadA5* (ดื้อยาสเตรปโตมัยซิน) *dfrA12* และ *dfrA17* (ดื้อยาไตรเมโทพริม) และ *linF* (ดื้อยาในกลุ่มลินโคซายไมด์) การศึกษาทางระบาดวิทยาเพื่อเข้าใจความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสืบสวนการแพร่กระจายตามชนิดของสายพันธุ์ (clonal spread) ในแบคทีเรียเหล่านี้โดยใช้ plasmid profiling, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC PCR) และ high throughput multi-locus sequence typing (HiMLST) ร่วมกับการเฝ้าระวังโรคโดยอาศัยพื้นที่สัมพันธ์กับเวลา (space-time disease surveillance) ไพรเมอร์จำเพาะต่อ 7 ยีนที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพของเชื้อ (housekeeping genes) ได้ถูกออกแบบสำหรับเพิ่มสารพันธุกรรมแบบลูกโซ่ (PCR) ยกเว้นยีน *adh* โดยใช้แบบแผนการแยกชนิด MLST ตาม Achtman (Achtman MLST typing) เพื่อให้ได้ขนาดของ DNA (amplicons) ที่เหมาะสมสำหรับระบบ 454 sequencing ในบรรดา 3 เทคนิคการแบ่งชนิด plasmid profiling มีอำนาจการจำแนกสายพันธุ์ (discriminatory power) สูงสุด (DI, 0.956) ในขณะที่อำนาจการจำแนกของวิธี ERIC PCR คล้ายกับวิธี HiMLST มาก (0.973 vs 0.979) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายในแต่ละกลุ่มของเชื้อ *E. coli* ชนิดก่อโรค ยกเว้น ST182 ทุกตัวอย่างเป็น ETEC จึงกล่าวได้ว่า ETEC บางสายพันธุ์มีการแพร่กระจายตามชนิดของสายพันธุ์นั้น (clonal spread) ในการศึกษาพบการแพร่กระจายตามชนิดของสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ที่น่าจะระบาด (possible outbreaks) สายพันธุ์ที่คงอยู่ (persistence clones) และสายพันธุ์ข้ามประเทศ (international spread clones) นอกจากนี้หลาย STs ยังจับคู่กับสายพันธุ์จากสัตว์เพื่อผลิตเป็นอาหารที่มีในฐานข้อมูล *E. coli* MLST การค้นพบนี้ได้เน้นบทบาทของการแพร่กระจายตามสายพันธุ์ในแบคทีเรียเหล่านี้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยสรุปการศึกษารุ่นนี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระยะยาวของเชื้อ *E. coli* ชนิดก่อโรคท้องเสียที่ก่อหลายขนานแบบมี class 1 integrons และชี้ให้เห็นถึงการหมุนเวียนของ class 1 integrons ในชุมชน ผลการศึกษาเหล่านี้เป็นข้อมูลสำคัญทางสาธารณสุขสำหรับการเฝ้าระวังและการควบคุมเชื้อโรคคือยาปฏิชีวนะในเอเชียภูมิภาค ด้วยราคาที่มีประสิทธิภาพของเทคนิค HiMLST ทำให้การแบ่งชนิดแบบ MLST สำหรับโครงการลำดับทางพันธุกรรมขนาดใหญ่แข็งแกร่งขึ้นอย่างแท้จริง ซึ่งสามารถปรับใช้สำหรับกลยุทธ์ใหม่ในการศึกษา MLST โดยใช้ next-generation sequencing (NGS) หรืองานประยุกต์ใหม่ในราคาที่สามารถจ่ายได้