คุณลักษณะของยีน *erm* (B), *mef* และ *mel* ในเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม macrolides ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

นางสาวเพาพงา มณฑนะพิศุทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION OF *erm* (B), *mef* AND *mel* GENES IN MACROLIDE-RESISTANT *Streptococcus pneumoniae* ISOLATED FROM PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL

Miss Paopa-nga Monthanapisut

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Microbiology
Interdisciplinary Program
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

511162

Thesis Title	CHARACTERIZATION OF *erm* (B), *mef* AND *mel* GENES IN MACROLIDE-RESISTANT *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLATED FROM PATIENTS AT KIING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL
By	Miss Paopa-nga Monthanapisut
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Principal Advisor	Tanittha Chatsuwan, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Graduate School
(Associate Professor Pornpote Piumsomboon, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Assistant Professor Anan Chongthaleong, M.D.)

.....Thesis Principal Advisor
(Tanittha Chatsuwan, Ph.D.)

.....External Member
(Associate Professor Somporn Srifuengfung, Ph.D.)

เพาพงา มณฑนะพิศุทธิ์ : คุณลักษณะของยีน *erm* (B), *mef* และ *mel* ในเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม macrolides ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (CHARACTERIZATION OF *ermB*, *mef* AND *mel* GENES IN MACROLIDE-RESISTANT *Streptococcus pneumoniae* ISOLATED FROM PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL). อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร.ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ, 149 หน้า.

การดื้อยา Macrolides ในเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* เป็นปัญหาเพิ่มสูงขึ้นในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย กลไกหลักที่เชื้อ *S. pneumoniae* ใช้ในการดื้อต่อยากลุ่ม macrolides มี 2 กลไกคือการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายของยาโดยการ methylation ที่ 23S rRNAซึ่งถูกกำหนดโดยยีน *erm* (B) และการขับยาออกจากเซลล์ (efflux pump) ซึ่งถูกกำหนดโดยยีน *mef* วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจหาความชุกของการดื้อยา macrolides และคุณลักษณะของยีนดื้อยาได้แก่ยีน *erm* (B) ยีน *mef* และยีน *mel* ในเชื้อ *S. pneumoniae* จำนวน 385 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2550 การทดสอบความไวรับต่อยา erythromycin, clarithromycin และ clindamycin ทำโดยวิธี Agar dilu ion ผลการศึกษาพบว่าความชุกของการดื้อยากลุ่ม macrolides ได้แก่ erythromycin เป็น 54.02% และ clarithromycin 53.76% ความชุกของการดื้อยา clindamycin 25.20% การตรวจหา phenotype ของการดื้อยากลุ่ม macrolides ทำโดยวิธี double disc diffusion ในเชื้อ *S. pneumoniae* 208 สายพันธุ์ที่ดื้อยา erythromycin พบว่าเชื้อจำนวน 96 สายพันธุ์ (46.15%) ดื้อยา erythromycin และ clindamycin และ มีลักษณะเป็น $cMLS_B$ phenotype ในขณะที่เชื้อจำนวน 112 สายพันธุ์ (53.85%) ดื้อยา erythromycin แต่ไวต่อยา clindamycin และมีลักษณะเป็น M phenotype การศึกษาครั้งนี้ไม่พบลักษณะ i MLS_B phenotype เมื่อทำการตรวจสอบหายีนดื้อยา macrolides ด้วยวิธี multiplex PCR พบยีน *erm* (B) จำนวน 95 สายพันธุ์ (45.67%) ยีน *mef* จำนวน 112 สายพันธุ์ (53.85%) และพบยีน *erm* (B) ร่วมกับยีน *mef* จำนวน 1 สายพันธุ์ (0.48%) เมื่อตรวจสอบชนิดของยีน *mef* (A/E) โดยวิธี PCR-RFLP พบว่าเชื้อ *S. pneumoniae* ที่มีลักษณะ M phenotype ทั้งหมดเป็นยีน *mef* (E) ค่า MIC ของยา erythromycin ในเชื้อ *S. pneumoniae* 112 สายพันธุ์ซึ่งมีลักษณะ M phenotype มีค่าลดลง 6-9 เท่าเมื่อใส่ CCCP ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง efflux pump ผลการทดสอบนี้เป็นการยืนยันการมีกลไกการขับยาออกเซลล์ในเชื้อเหล่านี้ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mef* (E) และยีน *mel* ในเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* จำนวน 10 สายพันธุ์ที่มีลักษณะ M phenotype ซึ่งมีค่า MIC ต่อยา erythromycin ในช่วง 1-16 µg/ml พบว่ายีน *mef* (E) มีนิวคลีโอไทด์ 1,218 bp (405 กรดอะมิโน) และยีน *mel* มีนิวคลีโอไทด์ 1,464 bp (487 กรดอะมิโน) และพบว่า มีความเหมือนกันในระดับของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *mef* และยีน *mel* ในเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์ รวมถึงเหมือนกับยีน *mef* (E) ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 630 bp บริเวณ upstream ของยีน *mef* พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จำนวน 23 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง T-31C, T-54G, A-78T, T-81G, A-82G, T-345A และการหายไปของนิวคลีโอไทด์ T ที่ตำแหน่ง -63 และ 16 bp ที่ตำแหน่ง -155 โดยเชื้อทั้ง 10 สายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลง 22 นิวคลีโอไทด์ โดยเชื้อ 4 สายพันธุ์ซึ่งมีค่า MIC ในช่วง 2-16 µg/ml มีการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นอีก 1 ตำแหน่งคือการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง T-345A ในขณะที่เชื้ออีก 6 สายพันธุ์ไม่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนี้ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง T-345A อาจจะมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของค่า MIC ในเชื้อ *S. pneumoniae* ที่มีลักษณะ M phenotype

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต เพาพงา มณฑนะพิศุทธิ์

ปีการศึกษา.....2551..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ

##4889180920 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD : / *Streptococcus pneumoniae* MACROLIDE-RESISTANT / *erm* (B)/ *mef* / *mel*

PAOPA-NGA MONTHANAPISUT : CHARACTERIZATION OF *ermB*, *mef* AND *mel* GENES IN MACROLIDE-RESISTANT *Streptococcus pneumoniae* ISOLATED FROM PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : TANITTHA CHATSUWAN, Ph.D., 149 p.

Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* is an increasingly recognized problem in many parts of the world including Thailand. Two main mechanisms of macrolide resistance in *S. pneumoniae* were due to alteration of drug target by methylation of 23S rRNA encoded by *erm* (B) and macrolide efflux encoded by *mef* gene. The purpose of this study was to investigate the prevalence of macrolide resistance and characterize the resistance gene including *erm* (B), *mef* and *mel* genes in *S. pneumoniae*. A total of 385 *S. pneumoniae* isolates were collected from patients at King Chulalongkorn Memorial Hospital between 2003-2007. Erythromycin, clarithromycin and clindamycin susceptibility were determined by agar dilution method. Prevalence of macrolide resistance was 54.02% for erythromycin and 53.76% for clarithromycin. Prevalence of clindamycin resistance was 25.20%. Macrolide resistance phenotypes were identified by double disc diffusion. Among the 208 erythromycin-resistant isolates, 96(46.15%) were resistant to both erythromycin and clindamycin and showed $cMLS_B$ phenotype, whereas 112(53.85%) were resistant to erythromycin but susceptible to clindamycin and exhibited the M phenotype. The $iMLS_B$ phenotype were not detected. Detection of macrolide resistance genes by multiplex PCR revealed that the *erm* (B) gene was found in 95 isolates (45.67%) and the *mef* gene was identified in 112 isolates (53.85%). One isolate (0.48%) carried both *mef* and *erm* (B) genes. Detection of *mef* (A/E) type genes was investigated by PCR-RFLP. The *mef* (E) gene was detected in all M phenotype isolates. The erythromycin MIC of 112 M-phenotype *S. pneumoniae* were decreased 6-9 fold in the presence of CCCP, an efflux pump inhibitor, confirming the presence of an efflux mechanism in these isolates. DNA sequence analysis of *mef* (E) and *mel* genes in 10 M-phenotype *S. pneumoniae* (MIC range 1-16 μg/ml) revealed a 1,218-bp ORF of entire *mef* (E) gene, encoding 405 amino acids and 1,464-bp ORF of entire *mel* gene, encoding 487 amino acids. All 10 sequences of entire *mef* and *mel* genes were identical to each other at the DNA and amino acid levels and also identical with the *mef* (E) published sequences in GenBank. Analysis of a 630 bp upstream region of *mef* (E) gene showed 23 nucleotide changes ; T-31C, T-54G, T deletion at position -63, A-78T, T-81G, A-82G, T-345A and 16 bp deletion at position -155 upstream of *mef* (E) gene in 10 M-phenotype *S. pneumoniae*. All ten isolates had 22 nucleotide changes. Four isolates with the MIC range of 2-16 μg/ml carried an additional mutation at T-345A whereas the other six isolates with the MIC range of 1-4 μg/ml had no substitution at this position. The results demonstrated that mutation at T-345A may be associated with increased erythromycin MIC in M-phenotype *S. pneumoniae*.

Field of study : Medical Microbiology Student's signature Paopenga Monthanapisut

Academic year : 2008 Principal Advisor's signature Tanittha Chatsuwan

ACKNOWLEDGEMENTS

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

This work was financially supported by grant from Annual Report for the year 2006 .The King Prajadhipok and Queen Rambhai Barni Memorial Foundation, Thai parliament.

I would like to thank my advisor, Dr. Tanittha Chatsuwan, for her kind and understanding my problems met during the study and for her encouraging words.

I would like to thank the, chairman of their committee, Assistant Professor Anan Chongthaleong, and the external examiner, Associated Professor Somporn Srifuengfung, for their suggestions and comments.

With special thanks to members of the laboratory center of *Streptococcus* and the staffs of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their cooperation and providing the isolates, facilities and encouragement. Thanks to all Ph.D. and M.Sc. students for happy memories from many activities.

My profound thanks the Dentistry Faculty of Thammasart University that to support the education in this time.

Finally my thanks and appreciations are due to my family for their endless love, understanding, encouragement and moral support during my study period.

CONTENT

PAGE

ABSTRACT (THAI)..... iv

ABSTRACT (ENGLISH)..... v

ACKNOWLEDMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... ix

LIST OF FIGURES..... x

ABBREVIATIONS..... xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION..... 1

II OBJECTIVES..... 4

III LITERATURE REVIEWS

1. BACTERIOLOGY..... 5
2. ANTIGENIC STRUCTURE..... 6
3. PATHOLOGY..... 8
4. DISEASES..... 9
5. TRANSMISSION..... 11
6. EPIDEMIOLOGY..... 12
7. LABORATORY DIAGNOSIS..... 14
8. TREATMENT OF *S. PNEUMONIAE* INFECTION..... 15
9. MACROLIDES..... 16
10. MECHANISM OF MACROLIDE RESISTANCE..... 20
11. OTHER MECHANISM OF MACROLIDE RESISTANCE OF *S. PNEUMONIAE*..... 28
12. PREVALENCE OF MACROLIDE REISTANCE OF *S. PNEUMONIAE*.....29

IV MATERIALS AND METHODS..... 32

1. BACTERIAL ISOLATES..... 33
2. IDENTIFICATION OF *S. PNEUMONIAE* ISOLATES..... 33
3. BIOCHEMICAL TESTS..... 34
4. MACROLIDE AND CLINDAMYCIN SUSCEPTIBILITY 36
5. DETECTION OF MACROLIDE RESISTANCE PHENOTYPE..... 39

PAGE

6. SCREENING FOR THE PRESENCE OF *MEF* AND *ERM* (B) GENES BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)..... 40
7. DETECTION OF *MEF* GENE TYPE..... 42
8. DETECTION OF EFFLUX PUMP..... 43
9. ANALYSIS OF ENTIRE MEF AND MEL GENES BY AUTOMATED SEQUENCING..... 44

V RESULTS

1. BACTERIAL STRAINS..... 48
2. DETERMINATION OF ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF *S. PNEUMONIAE*..... 51
3. PHENOTYPE DETECTION OF MACROLIDE RESISTANCE MECHANISM..... 55
4. SCREENING FOR *MEF* AND *ERM* (B) GENES..... 57
5. DETERMINATION OF *MEF* GENE TYPE BY PCR-RFLP 61
6. DETERMINATION OF MACROLIDE EFFLUX IN *S. PNEUMONIAE*..... 63
7. ANALYSIS OF ENTIRE *MEF* (E) AND ENTIRE *MEL* GENES BY PCR AND SEQUENCING..... 64

VI DISCUSSION..... 76

VII CONCLUSION..... 82

VIII REFERENCES..... 84

APPENDICES I..... 105

APPENDICES II..... 106

APPENDICES III..... 108

APPENDICES IV..... 110

APPENDICES V..... 128

APPENDICES VI..... 132

APPENDICES VII..... 136

APPENDICES VIII..... 140

APPENDICES IX..... 144

APPENDICES X..... 147

BIOGRAPHY..... 149

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

1 : Prevalence of antibiotic resistance amongst *S. pneumoniae* in different geographic areas..... 31

2 : Oligonucleotide primers used in polymerase chain reaction..... 35

3 : Acceptable limits for quality control strains used to monitor accuracy of minimal inhibitory concentrations (MICs)..... 37

4 : Scheme for preparing dilutions of antimicrobial agents to be used in agar dilution susceptibility tests..... 38

5 : Sequences of the oligonucleotides used as primers for PCR..... 40

6 : Sequences of the oligonucleotides used as primers for PCR and DNA sequencing..... 45

7 : Patients, demographic data and culture source of 385 isolates of *S. pneumoniae*..... 49

8 : Macrolides and clindamycin MICs and resistance rates of 385 *S. pneumoniae* isolates..... 52

9 : Antibiotic susceptibility of the erythromycin, clarithromycin and clindamycin among *S. pneumoniae* isolates collected during 2003-2007... 54

10 : Correlation between the resistance phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *S. pneumoniae* isolates..... 59

11 : The effect of macrolide efflux inhibitor (CCCP) on 112 erythromycin-resistant strains carrying *mef* gene..... 63

12 : Nucleotide sequence changes in upstream of *mef* gene in macrolide-resistant *S. pneumoniae* isolates..... 74

LIST OF FIGURES

FIGURES PAGE

1 : Predisposition to and the development of pneumococcal pneumonia.... 8
2 : Group of macrolides..... 17
3 : Structure of erythromycin..... 17
4 : Structure of ketolides..... 18
5 : Peptide bond synthesis catalysed by the peptidyl transferase center of the 50S ribosome subunit..... 19
6 : Structure of domainV of 23S rRNA..... 21
7 : Schematic representation of the structure of the mRNA from the inducible *erm* (B) gene..... 22
8 : Schematic representation of the two major classes of multidrug transporters 23
9 : Structural model for the 12-TMS multidrug transporters of the MFS.... 24
10 : Structure of the chromosomal genetic element Tn*1207.1*, which is 7,244-bp long..... 24
11 : Structure of the MEGA element which is 5,500-bp long..... 25
12 : Structure of the chromosomal genetic element *mef* gene, which is 1,218 bp long..... 26
13 : Structure representation the Tn*2009*, composed of the mega element inserted into a Tn*916*-like transposon..... 26
14 : Structure representation the Tn*2010*, composed of the mega element and *erm* (B) gene inserted into a Tn*916*-like transposon..... 27
15 : Methodology Scheme..... 32
16 : A multipoint inoculator..... 37
17 : Macrolide-susceptible strains and macrolide-resistant strains..... 37
18 : *S. pneumoniae* on the blood agar plate 50
19 : Gram stain of *S. pneumoniae*..... 50
20 : MIC distribution for erythromycin against 385 *S. pneumoniae* isolate..... 52
21 : MIC distribution for clarithromycin against 385 *S. pneumoniae* isolates.... 53
22 : MIC distribution for clindamycin against 385 *S. pneumoniae* isolates..... 53

FIGURES PAGE

23 : Macrolide resistance phenotypes in 208 erythromycin-resistant *S. pneumoniae* isolates..... 55
24 : Double disc diffusion test for macrolide resistance phenotypes..... 56
25 : Electrophoresis of *erm* (B) and *mef* PCR products by multiplex PCR..... 58
26 : Relationship between erythromycin susceptibility and macrolide resistance genes..... 58
27 : Prevalence of erythromycin resistance mechanism in *S. pneumoniae* isolated from 2003 to 2007..... 60
28 : Agarose gel electrophoresis of *mef* amplicon restricted with restriction enzyme *Bam*HI..... 61
29 : Restriction analysis of *mef* amplicon by *Dra*II..... 62
30 : Agarose gel electrophoresis of upstream-*mef* (E) 630 bp, entire *mef* (E) 1,646 bp and entire *mel* 1,955 bp amplical PCR products..... 66
31 : Multiple amino acid sequence alignment of entire Mef protein from 10 *mef*-positive *S. pneumoniae* isolates with those from *S. pneumoniae* (SP.AF274302) in GenBank..... 67
32: Multiple amino acid sequence alignment of Mef protein from *S. pneumoniae* (SP.AF274302) and those from *S. pyogenes* (SY.AF445042, SY.AY657002 and SY.AB227521), *S. salivarius* (SS.AJ318993), viridans streptococcus (SV.EF042094) and *S. pneumoniae* (SP.AF376746)..... 68
33 : Multiple amino acid sequence alignment of entire Mel protein from 10 *mel*-positive *S. pneumoniae* isolates with those from *S. pneumoniae* (SP.AF274302) in GenBank..... 69
34 : Multiple amino acid sequence alignment of Mel protein from *S. pneumoniae* (SP.AF274302) and those from *S. pyogenes* (SY.AF445042, SY.AY657002 and SY.AB227521), *S. salivarius* (SS.AJ318993), viridans streptococcus (SV.EF042094) and those of *S. pneumoniae* (SP.AF376746 and SP.AB426626)..... 71
35 : Multiple nucleotide sequence alignment of *mef-mel* intergenic region of 10 *S. pneumoniae* isolates with those from *S. pneumoniae* (SP.AF274302) in GenBank..... 72

FIGURES PAGE

36 : Multiple nucleotide sequence alignment of *mef-mel* intergenic region from *S. pneumoniae* (SP.AF274302) with those from *S. salivarius* (SS.AJ318993), viridans streptococcus (SV.EF042094) and *S. pneumoniae* (SP.AF376746)..... 73

37 : Multiple nucleotide sequence alignment of upstream of *mef* gene from 10 *mef*-positive *S. pneumoniae* isolates with those of *S. pneumoniae* (SP.AF274302 and SP.AF376746), *S. salivarius* (SS.AJ318993) and viridans streptococcus (SV.EF042094)..... 75

ABBREVIATIONS

A	adenine
bp	base pair
C	cytosine
CO_2	carbon dioxide
°C	degree celsius
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
DDW	double distilled water
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
DNA	deoxynucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
DW	distilled water
et al.	*et alii*
E-test	epsilometer test
g	gram
G	guanine
HCl	hydrochloric acid
hr	hour
i.e.	id test
M	molar
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride
MIC	minimum inhibitory concentration
min	minute (S)
ml	milliliter
mM	millimolar
mmol	millimole
NaCl	sodium chloride
Na_2HPO_4	sodium phosphate dibasic, anhydrous

NaOH	sodium hydroxide
CLSI	Institute Clinical Laboratory Standards
PCR	polymerase chain reaction
Pfu	*Pyrococcus furiosus*
*P*mol	picomol
sec	second
T	thymine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
U	unit
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
UV	ultraviolet
V	volt