**Thesis Title** Intracellular Proteins Produced by Fluoroquinolone Resistant and Extended Spectrum β - lactamase Producing Strains of *Escherichia coli* During Their Cultures Supplemented with Ciprofloxacin

**Author** Plt. Off. Wachiraphorn Eamjang

**Degree** Master of Science (Microbiology)

**Thesis Advisory Committee** Dr. Siriwoot Sookkhee Chairperson
Asst. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn Member

## ABSTRACT

Among 212 uropathogenic *E. coli*, it was found that there were 120 isolates exhibited the multidrug resistance to the tested antibiotic discs. In this study, extended - spectrum β - lactamase producing strains were recruited using the ESBL screening and confirmation assays. The results showed 84 isolates performed as ESBL producing *E. coli* (ESBL - EC). Interestingly, most of all ESBL - EC could resist to the tested fluoroquinolones namely, norfloxacin, ciprofloxacin and levofloxacin. Thirty seven strains of ESBL - EC which potentially resisted to these fluoroquinolones were carried out to determine their minimal inhibitory concentrations (MICs) towards ceftazidime and ciprofloxacin. The representative strain in the antibiograms, $CAZ^{1}CIP^{1}$, $CAZ^{R}CIP^{R}$, and all strains in $CAZ^{HR}CIP^{HR}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

were cultured in the various concentrations, 1/2, 1/4 and 1/8 fold of MIC of ciprofloxacin comparing with their cultures in the absence of drug. Their intracellular proteins were extracted, calculated and detected on SDS - PAGE. It was found that the interesting protein band was demonstrated in $CAZ^{HR}CIP^{HR}$ strains at ~ 19 kDa. By 2 - D gel comparison, 10 protein spots which detected at such molecular weight were selected, cut, digested and analyzed with LC - MS/MS. Proteomic results of computational identification showed that one of these protein spot was likely as DNA starvation/stationary phase protection protein (Dps). It is responsible to DNA condensation for protecting the chemical injuries. The characterization of this protein will be further studied.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

| | |
|---|---|
| **ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** | โปรตีนภายในเซลล์ที่ผลิตโดยเอชเชอริเชีย โคไล สายพันธุ์ดื้อยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน และผลิตเอนไซม์บีตาแลกแตเมส ชนิดฤทธิ์ขยาย ขณะเพาะเลี้ยงที่มียาซิโปรฟลอกซาซิน |
| **ผู้เขียน** | เรืออากาศตรีหญิง วชิราภรณ์ เอี่ยมแจง |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) |
| **คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | ดร. ศิริวุฒิ สุขขี ประธานกรรมการ<br>ผศ. ดร. สุมาลี พฤกษากร กรรมการ |

## บทคัดย่อ

เชื้อเอชเชอริเชีย โคไล ที่ก่อโรคในระบบทางเดินปัสสาวะจำนวน 212 ไอโซเลต พบว่ามีอยู่ 120 ไอโซเลต ที่แสดงการดื้อยาต้านจุลชีพได้หลายชนิด การศึกษานี้จะรวบรวมสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์บีตาแลกแตเมส ชนิดฤทธิ์ขยาย ด้วยวิธีทดสอบคัดกรอง และการวิเคราะห์ยืนยันต่อการผลิตเอ็นไซม์ดังกล่าว พบว่ามีทั้งสิ้น 84 ไอโซเลต ที่น่าสนใจ โดยสายพันธุ์เกือบทั้งหมดนี้สามารถดื้อต่อยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนด้วย ได้แก่ นอร์ฟลอกซาซิน ซิโปรฟลอกซาซิน และเลโวฟลอกซาซิน เชื้อผลิตเอ็นไซม์บีตาแลกแตเมส ชนิดฤทธิ์ขยายจำนวน 37 สายพันธุ์ ที่ดื้อยาฟลูออโรควิโนโลนร่วมด้วยจะถูกนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ของยาเซฟตาซิดีม และซิโปรฟลอกซาซิน เชื้อตัวแทนในกลุ่มที่แสดงรูปแบบการดื้อยาเป็น $CAZ^I$, $CIP^I$,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$CAZ^R$ $CIP^R$ และเชื้อทุกสายพันธุ์ในกลุ่ม $CAZ^{HR}$ $CIP^{HR}$ จะถูกนำมาเลี้ยงในความเข้มข้นต่างๆ ของยาซิโปรฟลอกซาซิน คือ 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบไม่มียา โปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรีย จะถูกสกัด คำนวณ และตรวจสอบบน SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนที่น่าสนใจ ในกลุ่มเชื้อที่มีรูปแบบการดื้อยาเป็น $CAZ^{HR}$ $CIP^{HR}$ ณ มวลโมเลกุลประมาณ ~ 19 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบเจล 2 - D PAGE พบว่ามีโปรตีน 10 จุด ณ มวลโมเลกุลดังกล่าวถูกเลือกตัด ย่อย และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC - MS/MS ผลทางโปรติโอมิกที่จำแนกชนิดของโปรตีนด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์แสดงให้เห็นว่า มีโปรตีน 1 จุดที่ควรเป็นโปรตีนชนิด DNA starvation/stationary phase protection protein (Dps) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับรวมกลุ่มของดีเอ็นเอเพื่อป้องกันภยันตรายทางเคมีต่างๆ และควรมีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ โปรตีนชนิดนี้ต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved