183251

รหัสโครงการ : RSA4680015

ชื่อโครงการ: การศึกษาเอนไซม์ β-lactamase class D จาก *Burkholderia pseudomallei*

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน:

ผศ. ดร. พรรณนิกา เนียมทรัพย์ (Ms. Pannika Niumsup)
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 0-5526-1000 ต่อ 4612
โทรสาร 0-55-26-1197

E-mail Address: pannikan@nu.ac.th, npannika@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 36 เดือน

การดื้อยา ceftazidime ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* จัดเป็นปัญหาที่สำคัญของการรักษาโรคเมลิออยโดสิส โดยกลไกหลักที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาคือการที่เชื้อสร้างเอนไซม์ β-lactamase(s) ออกมาย่อยสลายยา อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการสร้าง biofilm ก็มีบทบาทในการทำให้เชื้อดื้อต่อยาได้เช่นเดียวกัน ในปัจจุบันมีเชื้อ *B. pseudomallei* หลายสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา ceftazidime แต่ยังไม่มีการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อมากนัก โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา *B. pseudomallei* ที่ดื้อต่อยาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไวต่อยา ที่แยกได้จากผู้ป่วยทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ผลการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ที่ดื้อยา ceftazidime จำนวน 2 สายพันธุ์ มี intermediate resistance ต่อ imipenem ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีการสร้าง β-lactamase นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ที่ดื้อยา ceftazidime มี ribotype pattern ที่ต่างกันออกไปแสดงว่าสายพันธุ์ที่ดื้อยามีพันธุกรรมที่หลากหลาย การดื้อยาในสายพันธุ์ที่ดื้อยา ceftazidime 2 สายพันธุ์พบว่ามีผลมาจากเอนไซม์ β-lactamase class A และ D อย่างไรก็ตามในสายพันธุ์ที่ดื้อยา ceftazidime 1 สายพันธุ์พบว่าการดื้อยาเป็นผลมาจาก class D β-lactamase เพียงกลุ่มเดียว การศึกษา biofilm พบว่าสายพันธุ์ที่ดื้อยา ceftazidime 3 สายพันธุ์มีความสามารถในการสร้าง biofilm ต่ำกว่าสายพันธุ์ที่ไวต่อยา นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ที่มี ceftazidime MIC สูงที่สุด มีความสามารถในการสร้าง biofilm ต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะมีความสามารถในการสร้าง biofilm สูงหรือต่ำ เมื่อสร้าง biofilm ขึ้นมาแล้วก็ทำให้เชื้อดื้อต่อ ceftazidime resistance ในระดับสูงแสดงว่า *B. pseudomallei* biofilm อาจมีส่วนทำให้เชื้อดื้อยา ceftazidime ดังนั้นอาจเป็นไปได้ที่ว่าผลของการสร้างเอนไซม์ β-lactamase(s) และการสร้าง biofilm อาจเป็นเหตุผลสำคัญในการทำให้เชื้อดื้อต่อยา ceftazidime

การโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ class D β-lactamase (*bla*$_{OXA979b}$) จาก ceftazidime resistant *B. pseudomallei* สายพันธุ์ 979b พบว่า BlaOXA979b มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์, oxacillinase จาก *Ralstonia pickettii* มากที่สุด มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน 3 ตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับ B. pseudomallei BlaOXA ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลคือ G31A, E52A และ P260R โดย E52A เป็นตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับ active site อย่างไรก็ตามพบว่า *E. coli* ที่มี BlaOXA979b มีค่า MIC ต่อยา β-lactam ไม่แตกต่างจาก *E. coli* ที่มี LacZ และ ไม่มีความสามารถในการยอยสลาย ceftazidime หรือ imipenem จากการศึกษาพบว่า BlaOXA979b มีแอคติวิตีที่แคบโดยจะย่อยสลาย oxacillin และ cloxacillin เท่านั้น จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า class D β-lactamase อาจไม่มีบทบาทในการทำให้เชื้อดื้อต่อยา ceftazidime

Project Code : RSA4680015

Project Title: Molecular Investigation of β-lactamase class D in *Burkholderia pseudomallei*

Investigator: Ms. Pannika NIUMSUP, Ph.D
Department of Microbiology and Parasitology,
Faculty of Medical Science, Naresuan University,
Phitsanuloke, 65000
Tel: 0-5526-1000-4 ext. 4612, 08-98565063
Fax: 0-5526-1197
E-mail Address: pannikan@nu.ac.th, npannika@yahoo.com

Project Period: 36 Month

The development of resistance to ceftazidime is a problem in the treatment of severe melioidosis. The major resistant mechanism is the expression of the chromosomally encoded β-lactamase(s); however the formation of biofilm has also been suggested to contribute to resistance. Several ceftazidime-resistant *Burkholderia pseudomallei* strains have emerged but little is known about the characteristics of the resistant strains. This study characterized the ceftazidime-susceptible and ceftazidime-resistant *B. pseudomallei* strains isolated from patients in the Northeast, Thailand. Two ceftazidime resistant strains showed intermediate resistance to imipenem, the antibiotic that has been shown to be useful for *B. pseudomallei* exhibiting β-lactamase activity. Various ribotype patterns among ceftazidime resistant strains were observed; suggesting that the resistant strains are diverse in their genetic patterns. Both class A and D β-lactamases were shown to contribute to resistant phenotypes in two ceftazidime resistant strains. However, in one ceftazidime resistant strain, resistant phenotype seemed to be the result of only class D β-lactamase. The three ceftazidime resistant *B. pseudomallei* possessed lower ability to form biofilm than the susceptible strains. Furthermore, the strain that had the highest ceftazidime MIC possessed the lowest ability to form biofilm. Irrespective of biofilm forming ability, once the biofilm was formed, high level of ceftazidime resistance was observed in all strains tested, suggesting that *B. pseudomallei* biofilm contributed to ceftazidime resistance. Hence, the combination of β-lactamase(s) and biofilm formation could be the major reason for the emergence of resistant strains and the persistence of *B. pseudomallei* in asymptomatic host.

A class D β-lactamase gene from ceftazidime resistant *B. pseudomallei* strain, 979b, was cloned and sequenced. The encoded enzyme is an oxacillinase and is homologous to oxacillinases from *Ralstonia pickettii*. Three amino acids substitutions were detected: G31A, E52A and P260R. *E. coli* containing BlaOXA979b has similar MIC values to *E. coli* without plasmid and has no detectable ceftazidimase and imipenemase activities. Further characterization revealed that BlaOXA979b has narrow spectrum of activity, hydrolysed only oxacillin and cloxacillin. These results suggested that BlaOXA979b may not be involved in ceftazidime resistance.