บทคัดย่อ

175884

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิส ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่พบมากในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และออสเตรเลีย ผู้ป่วยที่ติดเชื้อดังกล่าวมีอัตราเสียชีวิตสูง ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการรักษา คือ ยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactam โดยเฉพาะ ceftazidime อย่างไรก็ตามมีรายงานพบว่าเชื้อสามารถดื้อยา ceftazidime ได้ ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อสามารถดื้อยาได้ คือ การสร้างเอนไซม์ β-lactamase ออกมา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง β-lactamase class A และ D ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงบทบาทของเอนไซม์ β-lactamase class D ว่ามีบทบาทในการทำให้เชื้อดื้อยา ceftazidime หรือไม่

เชื้อ *B. pseudomallei* 7 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ได้แก่ 316a, 316c, 365a, 365c, 392a, 392f และ 979b พบว่า สายพันธุ์ 316c, 365a และ 979b ดื้อต่อยา ceftazidime โดยเฉพาะ 979b ที่ให้ค่า MIC สูง (512 μg/ml) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างเอนไซม์ β-lactamase class D (bla_{OXA}) และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ β-lactamase class D (BlaOXA) จากทั้ง 7 สายพันธุ์ ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 810 bp และกรดอะมิโน 269 ตัว ซึ่งมีความเหมือน (% identity) กับเอนไซม์ OXA-22 มากที่สุด (51%) และพบส่วน conserved region ของ β-lactamase class D อยู่ 7 ส่วน โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในบริเวณนั้น เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 พบว่า สายพันธุ์ 979b มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 31 จากกรดอะมิโน alanine เป็น glycine ตำแหน่งที่ 52 จากกรดอะมิโน alanine เป็น glutamic acid และตำแหน่งที่ 260 เปลี่ยนจากกรดอะมิโน arginine เป็น proline ซึ่งส่วนใหญ่เอนไซม์ β-lactamase class D ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนมักจะทำให้คุณสมบัติของการย่อยสลายปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactam เปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งสามารถย่อยสลายยา ceftazidime ได้ ส่งผลให้เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถดื้อยา ceftazidime ได้ ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ 979b เป็นตัวแทนในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ β-lactamase class D ในเชื้อ *B. pseudomallei*

เมื่อนำสายพันธุ์ 979b มาศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ BlaOXA979b ด้วยการโคลนยีน bla_{OXA} เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) พบว่าเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมีขอบข่ายการย่อยสลายยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactam แคบ ยาที่เอนไซม์ BlaOXA979b ย่อยสลายได้ คือ cloxacillin และ oxacillin โดยมีค่า K_m เท่ากับ 44.54 $\pm$ 5.80 และ 17.90 $\pm$ 1.56 μM ตามลำดับ แต่ไม่สามารถย่อยสลายยาพื้นฐานที่เอนไซม์ β-lactamase class D ทั่วไปสามารถย่อยสลายได้ เช่น benzylpenicillin, ampicillin และ cephalothin รวมทั้งไม่สามารถย่อยสลายยา ceftazidime ได้ ดังนั้นจึงสรุปผลการศึกษาครั้งนี้ได้ว่า เอนไซม์ β-lactamase class D ที่สร้างจากยีน bla_{OXA} ในเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ 979b อาจไม่มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา ceftazidime ได้

Abstract

175884

Meliodosis, a fatal disease caused by *Burkholderia pseudomallei*, is endemic in Southeast Asia and Northern Australia. The disease is an important public health problem in this area and caused a high mortality in a patients that without prompt antimicrobial therapy. Currently, ceftazidime is an antibiotic of choice for treatment of severe melioidosis; however, strains resistant to ceftazidime have emerged. Mechanism of resistance is likely to be the production of β-lactamase, especially β-lactamases class A and class D. This study aimed to characterize β-lactamase class D from β-lactam resistant *B. pseudomallei*.

Seven clinical *B. psuedomallei* strains isolated from patients in Sappasitthiprason Hospital, Ubonratchathani (316a, 316c, 365a, 365c, 392a, 392f and 979b) were characterized. Strains 316c, 365a and 979b demonstrated resistant to ceftazidime, especially strain 979b whose MIC against ceftazidime was as high as 512 μg/ml. Analysis of bla_{OXA} of all strains and their deduced amino acid sequence showed that BlaOXA comprised of 810 bp and 269 amino acids. The amino acid sequence of all strains showed 51% identity with OXA-22 enzyme and contained 7 conserved regions of typical β-lactamase class D. In the strain 979b, there were three amino acids substitution: G31A, E52A and P260R.

$bla_{OXA979b}$ was cloned into *E. coli* BL21(DE3); however, BlaOXA979b was not detected hydrolysis activities. It showed that this enzyme has a narrow spectrum hydrolysis profile, hydrolysed only oxacillin and cloxacillin. The kinetic parameters of BlaOXA979b enzyme,K_m, for cloxacillin and oxacillin were 44.54 ± 5.80 and 17.90 ± 1.56 μM, respectively, suggesting that BlaOXA979b enzyme has high affinity for oxacillin than cloxacillin. Hydrolysis of ceftazidime was not apparent. These results suggested that BlaOXA979b may not be involved in β-lactam resistance.