RESISTANCE PLASMID METAGENOMICS IN HOSPITALIZED PATIENTS' GUT MICROBIOMES

TOSSAWAN JITWASINKUL 5136624 SIMM/D

Ph.D. (MEDICAL MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHANWIT TRIBUDDHARAT, M.D., Ph.D., PRAPAT SURIYAPHOL, Ph.D., SITHICHOKE TANGPHATSORNRUANG, Ph.D.

ABSTRACT

Nosocomial infections with multidrug-resistant pathogens cause colossal problems for a healthcare system. In theory, pathogens, environmental bacteria, and normal flora can regularly exchange their resistance genes among themselves. Resistance genes spread among these bacteria are the result of antibiotic usage in hospitals, gene transfer by plasmids and mobile genetic elements, and the presence of reservoirs of resistance genes, such as gut microbiome in patients. This study collected stool specimens from 7 patients from two different wards that had been hospitalized for longer than 7 days with more than two different classes of antibiotic use within 1 month. Extracted gut microbiomes' plasmids from patients and one healthy volunteer, with no history of hospitalization and no antimicrobial use for three years, were used for the study. Plasmids were extracted by alkaline lysis method, and were purified by CsCl-EtBr gradient centrifugation or enzyme treatment with lambda exonuclease, exonuclease I and Phi29 DNA polymerase. The *454* high-throughput sequencing (GS Junior) revealed DNA outputs from approximately 9 to 81 Mega base-pairs. By an integration of NCBI BLAST and Pfam, most predicted resistance proteins conferred the resistance to most antimicrobial drug groups, and some belonged to unknown DNA. In addition, by using ResFinder and BioEdit for analysis, highly similar *aph(3')*-III gene variants together with flanking regions were found in both patients and a healthy control indicating that these resistance genes have been transferred between a community and hospitals. Several nosocomial resistance genes, namely *ant(6)-Ia*, *ermB*, *lnuB*, *tetL* and *tetU*, conferring resistance to aminoglycosides, lincosamide, macrolides, streptogramin B and tetracycline, spread among different patients within the same ward and between different wards. Several other resistance genes responsible for resistance to beta-lactam, rifampin, chloramphenicol, trimethoprim, sulfonamide, and fosfomycin were also detected in one patient. However, discovered resistance genes from both Pfam and Resfinder have not been related to antimicrobial drug treatment. It may be the result of linkage disequilibrium of genes and some resistance mechanisms on chromosome. Moreover, some present plasmid types were reported that linked with the discovered resistance genes, though resistance genes and plasmid replicons were not on the same sequences. From our findings, there were limitations on resistance gene sequencing coverage, because the tremendous size of DNA from gut microbiomes is about 10^8 times of sequencing output for each individual patient. Future study needs better plasmid extraction methods and higher outputs of DNA for sequencing to disclose enormous gut microbiome plasmids.

KEY WORDS: RESISTANCE GENE/ GUT MICROBIOME/ PLASMID/ HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING/ METAGENOMICS

143 pages

การศึกษาเมตาจีโนมิกส์ของพลาสมิดดื้อยาในเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของผู้ป่วยที่นอนโรงพยาบาล
RESISTANCE PLASMID METAGENOMICS IN HOSPITALIZED PATIENTS' GUT MICROBIOMES

ทศวรรณ จิตรวศินกุล 5136624 SIMM/D

ปร.ด. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, M.D., Ph.D., ประพัฒน์ สุริยผล, Ph.D., สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง, Ph.D.

บทคัดย่อ

การติดเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลเป็นปัญหาที่สำคัญมากในระบบสาธารณสุข เชื้อก่อโรค, เชื้อในสิ่งแวดล้อม และเชื้อประจำถิ่นสามารถแลกเปลี่ยนยีนดื้อยาซึ่งกันและกันและเกิดการแพร่กระจายยีนดื้อยาได้ การแพร่กระจายยีนดื้อยามาจากปัจจัยต่างๆ ได้แก่ การใช้ยาต้านจุลชีพ, กลไกการส่งต่อยีนดื้อยาโดยพลาสมิดและ mobile genetic elements, และเชื้อที่เป็นแหล่งกักเก็บยีนดื้อยา การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บอุจจาระจากผู้ป่วย 7 คนจากหอผู้ป่วยอายุรกรรมและหอผู้ป่วยอายุรกรรมวิกฤติ โดยผู้ป่วยอยู่โรงพยาบาลมากกว่า 7 วัน และได้รับยาต้านจุลชีพมากกว่า 2 กลุ่มภายใน 1 เดือน อุจจาระควบคุมเก็บมากจากคนสุขภาพดี 1 คนที่ไม่ได้นอนโรงพยาบาลและไม่ได้รับประทานยาต้านจุลชีพมาเป็นเวลา 3 ปี พลาสมิดถูกนำมาสกัดจากอุจจาระด้วยวิธี plasmid alkaline lysis และถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย CsCl-EtBr gradient centrifugation หรือ enzyme treatment with lambda exonuclease, exonuclease I และ Phi29 DNA polymerase พลาสมิดที่ได้ถูกนำมาอ่านลำดับเบสด้วย *454* High-throughput sequencing (GS Junior) และถูกอ่านความยาวได้ 9 ถึง 81 ความยาวเบส การใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศ NCBI BLAST และ Pfam, แสดงถึงโปรตีนที่ถูกสร้างให้มีความสามารถในการดื้อต่อยาต้านจุลชีพเกือบทุกชนิดซึ่งเคยถูกค้นพบบนโครโมโซม พลาสมิด และบนตำแหน่งซึ่งไม่สามารถระบุได้ นอกจากนี้การใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศ ResFinder และ BioEdit ยังชี้ให้เห็นลำดับเบสของยีน *aph(3′)*-III และลำดับเบสข้างเคียงว่ามีความใกล้เคียงกันทั้งเชื้อในลำไส้ผู้ป่วยและและในลำไส้กลุ่มควบคุม แสดงว่ายีนดื้อยานี้มีการส่งต่อกันระหว่างเชื้อที่พบในชุมชนและโรงพยาบาล นอกจากนี้ยังพบยีนดื้อยาที่เคยพบระบาดในโรงพยาบาล ได้แก่ *ant(6)-Ia*, *ermB*, *lnuB*, *tetL* และ *tetU* ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides, lincosamide, macrolides, streptogramin B และ tetracycline แพร่กระจายระหว่างผู้ป่วยในหอผู้ป่วยเดียวกันและหอผู้ป่วยที่ต่างกัน อีกทั้งในผู้ป่วย 1 คนจากหอผู้ป่วยอายุรกรรมยังมียีนดื้อยาต่อยาในกลุ่ม beta-lactam, rifampin, chloramphenicol, trimethoprim, sulfonamide และ fosfomycin อย่างไรก็ตามยีนดื้อยาที่พบไม่สัมพันธ์กับยาต้านจุลชีพที่ผู้ป่วยได้รับ ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นอาจมาจาก linkage disequilibrium ของยีน และ กลไกการดื้อยาอาจเกิดขึ้นบนโครโมโซมที่ปะปนมาได้ นอกจากนี้ไม่มีดีเอ็นเอเส้นใดที่บรรจุทั้งยีนดื้อยาและลำดับเบสที่บอกชนิดของพลาสมิด แต่พลาสมิดบางชนิดที่พบเคยมีรายงานว่าสัมพันธ์กับยีนดื้อยา ในการศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดบางประการคือ ดีเอ็นเอจากเชื้อในลำไส้มีความหลากหลายและมีปริมาณมากว่าประสิทธิภาพของเครื่องมือ high-throughput sequencing ที่จะเผยให้เห็นลำดับเบสของดีเอ็นเอ ได้ถึง 10^8 เท่า รวมทั้งงบประมาณที่จำกัด การศึกษาในอนาคตจึงต้องการวิธีสกัดพลาสมิดและเครื่อง high-throughput sequencing ที่ดีขึ้นในการศึกษาเมตาจีโนมิกส์ของพลาสมิดดื้อยาจากเชื้อในลำไส้ต่อไป

143 หน้า