Abstract

Project Code : TRG5880129

Project Title : Investigation of imipenem hypersusceptible mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Investigator : Dr. Piyatip Khuntayaporn
Faculty of Pharmacy, Mahidol University

E-mail Address : piyatip.khn@mahidol.ac.th

Project Period : 2 years

Pseudomonas aeruginosa is a well-known microorganism which has been concerned as one of the most emerging threats in this century. Serious infections caused by this pathogen are often treated by carbapenems which were considered as one of the last resort antibiotics. Unfortunately, carbapenems resistance in Gram-negative bacteria including *P. aeruginosa* was increasing. In this study, we were aimed to identify two mainly molecular mechanisms which believed to be involved in imipenem hypersusceptible. The first mechanism was *nfxB* mutant which can be resulting in overexpression of mexCD-oprJ efflux pump systems. The specific primers were designed for *nfxB* gene. PCR products were submitted for sequencing. However, *nfxB* mutant strain were identified but those mutant were silent mutation. The second mechanism was metallo-beta-lactamase (MBL) production which was important carbepenems resistance mechansims and usually related with nosocomial infections caused by *P. aeruginosa*. Since MBLs gene have varied sequences, five pairs of primers were designed to cover at least 45 genes. Each set of primers was optimized and PCR products were submit for sequencing. This study was able to detect IMP-1, IMP-13, IMP-14a and VIM-2. Moreover, this study was able to identify novel IMP-type MBLs, IMP-65, which present high similarity to IMP-14. It was also noteworthy that these genes, IMP-14 and variants, were identified only in clinical isolates related to Thailand. However, those genes were identified in carbapenems resistance *P. aeruginosa* but none in imipenem hypersusceptible. Multilocus sequence typing method was used to determine and compare dissemination traits of imipenem hypersusceptible and MBL harboring CR-MDR *P. aeruginosa*. ST235 was detected in both groups. Moreover, ST235 was found as a major ST type in Thailand followed by ST964 and ST111. There were also many STs which never been reported in Thailand including ST273, ST292, ST621, ST1584 and ST1816. This study was also help emphasized the dissemination trait difference of MBL-harbored *P. aeruginosa* between Thailand and European countries.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, Metallo beta-lactamase, *nfxB*, IMP-65, Multilocus sequence typing

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5880129

ชื่อโครงการ : การศึกษากลไกซึ่งส่งผลให้ยาอิมิพีเนมไวในเชื้อ*ซูโดโมแนส แอรูจิโนซา*ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด

ชื่อนักวิจัย : ดร. ปิยทิพย์ ขันตยาภรณ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
E-mail Address : piyatip.khn@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (ก.ค. 2558 – มิ.ย. 2560)

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นหนึ่งในเชื้อที่จัดว่าเป็นภัยอันตรายในศตวรรษนี้ การติดเชื้อ *P. aeruginosa* ชนิดรุนแรงมักได้รับการรักษาด้วยยากลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งถือเป็นยากลุ่มทางเลือกท้ายๆ ของการรักษาการติดเชื้อ อย่างไรก็ตามพบว่ามีการดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนมมากขึ้นโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมลบซึ่งรวมถึงเชื้อ *P. aeruginosa* นี้ด้วย ในโครงการวิจัยนี้ต้องการศึกษาเกี่ยวกับกลไกหลักๆ สองกลไกที่เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการส่งผลให้เชื้อ *P. aeruginosa* ไวต่อยาอิมิพีเนม ในกลไกแรกนั้นจะเกี่ยวข้องกับการศึกษายีน *nfxB* ซึ่งเชื่อว่าการกลายพันธุ์ของยีนนี้จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ mexCD-oprJ efflux pump ซึ่งการศึกษาทำโดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *nfxB* จากนั้นทำการปรับสภาวะของ PCR ให้เหมาะสมและ PCR products ที่ได้จะถูกส่งไปหาลำดับเบส จากผลการทดลองพบว่ายีน nfxB มีการกลายพันธุ์หลายจุดแต่การกลายพันธุ์เกิดขึ้นในลำดับเบสที่ 3 ของชุด codon ซึ่งไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโปรตีน และกลไกที่สองที่ทำการศึกษาเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ metallo beta-lactamase ซึ่งเป็นกลไกที่พบได้บ่อยในเชื้อ *P. aeruginosa* โดยเฉพาะในสายพันธุ์ที่มักเกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส แต่เนื่องจากยีนกลุ่ม MBLs มีความหลากหลายสูง ดังนั้นจึงแบ่งชุด primer ออกเป็น 5 ชุดเพื่อให้สามารถครอบคลุมได้อย่างน้อย 45 ยีน primer แต่ละชุดจะถูกปรับให้มีสภาวะที่เหมาะสมและ PCR product ที่ได้จะถูกส่งไปหาลำดับเบส ในการศึกษานี้ได้พบยีน IMP-1, IMP-13, IMP-14a และ VIM-2 นอกจากนี้แล้วยังสามารถค้นพบยีน IMP ชนิดใหม่คือ IMP-65 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ IMP-14 และเป็นที่น่าสังเกตว่ายีนกลุ่มนี้ (IMP-14 and variants) จะพบเฉพาะเชื้อที่มีความเกี่ยวข้องกับประเทศไทยเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามยีนที่สร้างเอนไซม์ metallo beta-lactamase เหล่านี้ตรวจพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งจากการพบยีนใหม่นี้นำมาซึ่งการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อทั้งสองกลุ่มมาเปรียบเทียบกันและเปรียบเทียบกับประเทศอื่นๆ ด้วย จึงใช้วิธี multilocus sequence typing ซึ่งพบว่า ST235 เป็น ST หลักของทั้งสองกลุ่ม นอกจากนี้แล้วยังพบว่า ST235 เป็น ST หลักในประเทศไทย และลำดับรองลงมาคือ ST964 และ ST111 นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบ ST อีกหลายชนิดซึ่งไม่เคยมีการรายงานในประเทศไทยมาก่อนได้แก่. ST273, ST292, ST621, ST1584 และ ST1816 นอกจากนี้การศึกษานี้ยังช่วยบ่งชี้ให้เห็นความแตกต่างระหว่างระบาดวิทยาของประเทศไทยและประเทศในทวีปยุโรป

คำหลัก : *ซูโดโมแนส แอรูจิโนซา*, เอนไซม์เมทัลโลเบต้าแลคแทมเมส, ยีน *nfxB*, ยีน IMP-65, มัลติโลคัสซีเควนไทป์ปิ้ง