รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษากลไกซึ่งส่งผลให้ยาอิมิพีเนมไวในเชื้อ*ซูโดโมแนส แอรูจิโนซา*ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด

โดย

ดร. ปิยทิพย์ ขันตยาภรณ์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

มิถุนายน 2560

สัญญาเลขที่ TRG5880129

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษากลไกซึ่งส่งผลให้ยาอิมิพีเนมไว
ในเชื้อ*ซูโดโมแนส แอรูจิโนซา*ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด

ดร. ปิยทิพย์ ขันตยาภรณ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยมหิดล

(ความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้วิจัย
สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดลไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษากลไกซึ่งส่งผลให้ยาอิมิพีเนมไวในเชื้อซู*โดโมแนส แอรูจิโนซา*ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและมหาวิทยาลัยมหิดล ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร. มัลลิกา ชมนาวัง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้เป็นที่ปรึกษาในการทำโครงการวิจัยนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณ ดร. มนตรี ยะสาวงษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการสอนทำ phylogenetic tree และ น.ส. วริยา แย้มประยูรสวัสดิ์ ที่ช่วยทำงานวิจัยบางส่วน นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณบุคลากรของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ดร. ปิยทิพย์ ขันตยาภรณ์

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

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	i
Abstract	ii
บทคัดย่อ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	2
บทที่ 3 ผลการทดลอง	4
บทที่ 4 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	24
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	28

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้าที่
1	การแบ่งกลุ่มยีน metallo beta-lactamase ที่สามารถตรวจหาได้จากแต่ละชุด primer	4
2	ลำดับไพรเมอร์ของแต่ละกลุ่มเพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน metallo beta-lactamases	5
3	PCR condition ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบยีน metallo-beta-lactamases	6
4	ไพรเมอร์เพื่อใช้ในจำแนกชนิดยีน IMP-type metallo-beta-lactamases	9
5	การแบ่งกลุ่มยีนที่สามารถจำแนกได้จากแต่ละชุด primer	9
6	PCR condition ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ไพรเมอร์ในการจำแนกยีน IMP-type metallo-beta-lactamase	9
7	ไพรเมอร์เพื่อใช้ในศึกษายีน *nfxB*	10
8	PCR condition ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ไพรเมอร์ในการศึกษายีน *nfxB*	10
9	ไพรเมอร์เพื่อใช้ในศึกษายีน *blaIMP-novel*	17
10	PCR condition ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษายีน *blaIMP-novel*	17
11	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการศึกษา multilocus sequence typing	22
12	ผลการศึกษา MLST ของเชื้อ *P. aeruginosa* ของเชื้อที่มีความไวต่อยา imipenem และเชื้อที่ตรวจพบเอนไซม์ metallo beta-lactamase	23

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้าที่
1	ตัวอย่างผลของ gel electrophoresis ในการตรวจสอบยีน IMP-type metallo-beta-lactamase	7
2	ตัวอย่างผลของ gel electrophoresis ในการตรวจสอบยีน VIM-type metallo-beta-lactamase	8
3	ผลของ gel electrophoresis ของยีน *nfxB*	11
4	ผล multiple alignment ของยีน *nfxB* จาก clinical isolated *P. aeruginosa*	15
5	ลำดับเบสของยีน *nfxB* พร้อม protein sequence	16
6	ผลของ gel electrophoresis ของยีน IMP ชนิดใหม่	18
7	ลำดับเบสของ IMP ชนิดใหม่เปรียบเทียบกับ IMP ที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกัน	20
8	ลำดับโปรตีนที่แปลออกมาของยีน IMP ชนิดใหม่	20
9	phylogenetic tree ของ IMP-type MBLs	21

บทที่ 1
บทนำ

Pseudomonas aeruginosa เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สำคัญ และยังเป็นหนึ่งในเชื้อกลุ่ม ESKAPE ซึ่งจัดเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญแห่งศตวรรษที่ 21[1] โดยยาปฏิชีวนะที่แนะนำให้ใช้ในการรักษาการติดเชื้อรุนแรงโดย *P. aeruginosa* คือยากลุ่มคาร์บาพีเนม (carbapenems) โดยยากลุ่มนี้มีความสามารถในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่กว้างและสามารถทนต่อเอนไซม์เบต้าเลคเทมเมสส่วนใหญ่ได้ นอกจากนั้นแล้วยากลุ่ม carbapenems ยังจัดเป็นยากลุ่มท้ายๆ ที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่รุนแรงต่าง ๆ[2] ตัวอย่างของยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่ อิมิพีเนม (imipenem) เมโรพีเนม (meropenem) และโดริพีเนม (doripenem) แต่ถึงแม้ว่ายากลุ่ม carbapenems จะมีคุณสมบัติที่ดี แต่โครโมโซมของเชื้อ *P. aeruginosa* มีกลไกที่สามารถดื้อต่อยาได้หลายกลไกและยังสามารถรับกลไกการดื้อยาใหม่ๆ เข้าไปได้ผ่านทางการรับ plasmid กลไกการดื้อยาที่สำคัญในเชื้อ *P. aeruginosa* ได้แก่ กลไก efflux pump ซึ่งจะเร่งการขับยาออกจากเซลล์, การลดการสร้างโปรตีน OprD ที่ช่วยในการนำยาเข้าเซลล์และการสร้างเอนไซม์กลุ่ม carbapenemase ที่ทำลายยากลุ่ม carbapenems[3, 4] และเมื่อเร็วๆ นี้ WHO ยังประกาศให้เชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems เป็นเชื้อกลุ่มที่มีความจำเป็นเร่งด่วน[5]

โดยทฤษฎีแล้วยาเมโรพีเนมจะมีโอกาศที่เชื้อ *P. aeruginosa* จะดื้อต่อยาได้ยากกว่าเนื่องจากต้องใช้กลไกในการดื้อยาร่วมกันถึงสองกลไกคือการเพิ่มการสร้าง efflux pump และลดการสร้างโปรตีน oprD แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานบางฉบับพบสายพันธุ์แบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีความไวต่อยาอิมิพีเนม[6] ซึ่งความพยายามเพื่อจะอธิบายเกี่ยวกับกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเหตุการณ์เช่นนี้ยังไม่ชัดเจน ทฤษฎีส่วนมากจะพยายามอธิบายเกี่ยวกับการเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน *nfxB* ซึ่งเป็นผลให้เกิดการสร้าง mexCD-oprJ efflux pump systems สูงขึ้นมาก[7] แต่จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของผู้วิจัยพบว่ามีสายพันธุ์ที่มีความไวต่อยาอิมิพีเนมแต่กลับไม่พบการเพิ่มปริมาณของ *mexD* mRNA ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าสายพันธุ์ที่มีความไวต่อยาอิมิพีเนมนั้นน่าจะเป็นผลโดยหลักจากการสร้างโปรตีน OprJ และนอกจากนี้แล้วความเป็นไปได้อีกกรณีหนึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์กลุ่ม metallo-beta-lactamase ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายยาแต่ละชนิดในกลุ่ม carbapenems ได้แตกต่างกัน ซึ่งในเอนไซม์กลุ่ม metallo beta-lactamase หลายชนิดพบว่าค่า MIC ของยา imipenem ต่ำกว่ายา meropenem[8] ดังนั้นในการศึกษานี้จึงสนใจศึกษากลไกซึ่งทำให้เชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิดซึ่งจะเป็นความรู้ซึ่งช่วยในการจัดการกับเชื้อดื้อยาในอนาคตได้ และนอกจากนี้แล้วยังทำให้เกิดความรู้ที่เกี่ยวข้องกับกลไกดื้อยาในเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นอีกด้วย

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- ศึกษาหากลไกในระดับโมเลกุลที่ส่งผลให้เชื้อมีความไวต่อยาอิมีพีเนม
- ศึกษาลักษณะของยีน *oprJ* ในเชื้อ *P. aeruginosa*
- ศึกษาเอนไซม์ metallo beta-lactamase ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด
- พัฒนาเชื้อสายพันธุ์ *P. aeruginosa* (**Δ***mexCD-oprJ*)::*lac oprJ*

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษายีนที่สร้างเอนไซม์กลุ่ม metallo beta-lactamase

ในการศึกษายีนที่สร้างเอนไซม์กลุ่ม metallo beta-lactamase โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) เนื่องจากยีนของเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันมาก จึงจำเป็นต้องมีการออกแบบ primer หลายคู่ และออกแบบ primer เพื่อให้สามารถตรวจสอบยีนในกลุ่มนี้ให้ได้มากที่สุด โดยจะเน้นออกแบบไพรเมอร์ให้ตรวจสอบยีนกลุ่ม VIM-1 ถึง VIM-25, IMP-1 ถึง IMP-25, และยีน NDM-1 หลังจากนั้นทำการปรับเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบ โดยคู่ primer ที่ออกแบบในขั้นตอนนี้คือ primer IMP-A, primer IMP-B, primer IMP-C, primer VIM-D, primer VIM-E และ primer NDM-1

จีโนมทั้งโครโมโซมและพลาสมิดถูกสกัดจากเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่ได้จากทางคลินิกเพื่อใช้เป็นต้นแบบในขบวนการ PCR และ PCR product ถูกนำไปหาขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

2.2 การตรวจสอบลำดับยีนของ metallo beta-lactamase

PCR product ของยีนกลุ่ม metallo beta-lactamase (จากข้อ 2.1) ในเชื้อที่นำมาทดสอบถูกส่งไปหาลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencing และใน PCR product ที่ไม่สามารถระบุชนิดของ metallo beta-lactamase ได้แน่ชัด ได้ทำการออกแบบ primer คู่ใหม่ได้แก่ primer IMP-G, primer IMP-H และ primer 1337 เพื่อให้สามารถระบุชนิดของ metallo beta-lactamase จากนั้นได้ทำการหา PCR condition ที่เหมาะสมของ primer ชุดใหม่นี้

PCR product ของ metallo beta-lactamase จาก primer กลุ่มนี้ถูกนำส่งไปหาลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อระบุชนิดของเอนไซม์ metallo beta-lactamase

2.3 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *nfxB*

ในการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *nfxB* นั้นใช้วิธีการ PCR เช่นกัน โดย primer ถูกออกแบบเพื่อเพิ่มจำนวนยีน *nfxB* และครอบคลุมในส่วน upstream ที่สำคัญของยีน *nfxB* หลังจากนั้นได้ทำการปรับเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR ที่ใช้ในการทดสอบเพื่อให้ได้ PCR product ของ *nfxB* ปริมาณสูง

จีโนมทั้งโครโมโซมและพลาสมิดถูกสกัดจากเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ที่ได้จากทางคลินิกเพื่อใช้เป็นต้นแบบในขบวนการ PCR และ PCR product ถูกนำไปหาขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis นอกจากนี้แล้ว PCR product ของเชื้อที่คัดเลือกมานี้ได้ถูกนำส่งไปหาลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencing และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาความเป็นไปได้ที่ยีน *nfxB* จะเกิดการกลายพันธุ์

2.4 การตรวจสอบยืนยันลำดับเบสของยีน metallo beta-lactamase ชนิดใหม่

ยีน imipenemase ซึ่งมีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับยีน IMP-14 และคาดว่าเป็น allele ใหม่ถูกนำมาทำ PCR โดยใช้ DNA polymerase ที่เป็น proof reading และส่งไป sequence เพื่อยืนยันลำดับเบสอย่างน้อย 3 ครั้ง Primer ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน allele ใหม่ถูกออกแบบมาให้ครอบคลุมตั้งแต่ start codon ถึง stop codon และทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR condition เมื่อได้ PCR product แล้วนำไปโคลนเข้ากับพลาสมิด pGem®-T Easy และทำการส่ง sequence เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง โดยผล sequence ที่ได้ ถูกส่งเข้าไปที่ NCBI เพื่อขอ allele ใหม่ของยีน imipenemase

2.5 การเปรียบเทียบความเกี่ยวข้องของยีน imipenemase ชนิดใหม่กับยีนในกลุ่มเดียวกัน

ลำดับเบสของยีน imipenemase ชนิดใหม่และยีนในกลุ่ม imipenemase ที่เคยมีรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบความเกี่ยวข้องกันและสร้างออกมาเป็น phylogenetic tree โดยใช้ MEGA program version 7.0.26

2.6 การศึกษาหาการกระจายตัวของเชื้อด้วยวิธี MLST

เชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน MBLs และเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็นเชื้อ imipenem hypersusceptible ถูกนำไปศึกษา sequence typing เพื่อดูการระบาดและเป็นการเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ในการศึกษาอื่นๆ โดยการหา sequence typing ทำโดยการทำ PCR ยีน 7 ยีน โดยในการทดลองได้ออกแบบ primer ใหม่ 2 คู่สำหรับยีน *mutL* และ *nuoD* และทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมโดย PCR product ที่ได้ของทั้ง 7 ยีนในเชื้อแต่ละตัวถูกส่งไปหาลำดับเบส โดยผลการทำ sequence ที่ได้ถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล MLST (http://pubmlst.org/paeruginosa/)

บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 การศึกษายีนที่สร้างเอนไซม์กลุ่ม metallo-beta-lactamase

ในการศึกษายีนที่สร้างเอนไซม์กลุ่ม metallo beta-lactamase โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) เนื่องจากยีนของเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความแตกต่างกันมาก จึงจำเป็นต้องมีการออกแบบ primer หลายคู่ และออกแบบ primer เพื่อให้สามารถตรวจสอบยีนในกลุ่มนี้ให้ได้มากที่สุด โดยจะเน้นออกแบบไพรเมอร์ให้ตรวจสอบยีนกลุ่ม VIM-1 ถึง VIM-25, IMP-1 ถึง IMP-25, และยีน NDM-1 หลังจากนั้นทำการปรับเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR เพื่อใช้ในการตรวจสอบ โดยคู่ primer ที่ออกแบบในขั้นตอนนี้คือ primer IMP-A, primer IMP-B, primer IMP-C, primer VIM-D, primer VIM-E และ primer NDM-1 ซึ่งกลุ่ม primer ที่ออกแบบมานี้แบ่งตามแนวโน้มความเกี่ยวเนื่องกันจาก phylogenetic tree [9]. โดย primer ที่ออกแบบมาแต่ละคู่จะสามารถตรวจสอบชนิดของยีนได้ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มยีน metallo beta-lactamase ที่สามารถตรวจหาได้จากแต่ละชุด primer

Group	Primer	Detectable gene
IMP-A	IMP-AF	IMP-1, IMP-3, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-7, IMP-9, IMP-10, IMP-15, IMP-25, IMP-26
	IMP-AR	
IMP-B	IMP-BF	IMP-1, IMP-11, IMP-16, IMP-21, IMP-22
	IMP-BR	
IMP-C	IMP-CF	IMP-1, IMP-2, IMP-8, IMP-12, IMP-13, IMP-14, IMP-18, IMP-19, IMP-20, IMP-24, IMP-32, IMP-48
	IMP-CR	
VIM-D	VIM-DF	VIM-2, VIM-3, VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10, VIM-11, VIM-14, VIM-15, VIM-16, VIM-17, VIM-18, VIM-20, VIM-23, VIM-24
	VIM-DR	
VIM-E	VIM-EF	VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-5, VIM-12, VIM-19, VIM-25
	VIM-ER	

ลำดับเบสของเอนไซม์ metallo-beta-lactamases ได้จากเวปฐานข้อมูลของ NCBI (เข้าถึงได้จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) หลังจากนั้นนำมาทำ alignment เพื่อหา conserved sequence ของแต่ละกลุ่มไพรเมอร์ โดยในการหา conserved sequence จะใช้ยีน IMP-1 และ VIM-2 ร่วมในทุกกลุ่มของไพรเมอร์ IMP-Type และ VIM-type metallo-beta-lactamases ตามลำดับ เพื่อใช้เป็น control โดยไพรเมอร์แต่ละกลุ่มแสดงตามตารางที่ 2 และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ดังตารางที่ 3 โดยส่วนประกอบในการทำ PCR 50 µL คือ ใช้ DNA template ประมาณ 100 ng, 0.4 µM of each primer, 1 mM of dNTPs, 0.5 units of Taq DNA polymerase, 1X buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$) หลังจากนั้นเติมน้ำเพื่อปรับปริมาตร และเฉพาะในการทำ PCR ของกลุ่ม IMP-B จะต้องเพิ่ม 4% DMSO

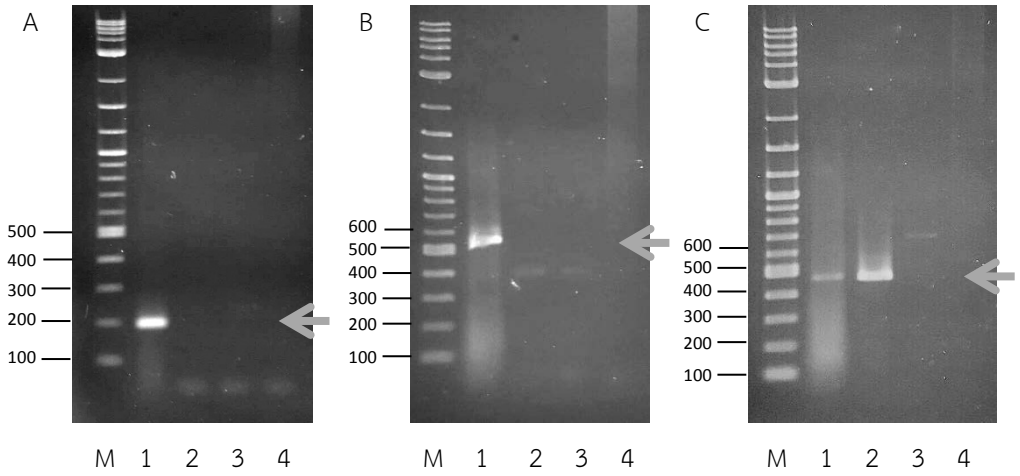
ตารางที่ 2 ลำดับไพรเมอร์ของแต่ละกลุ่มเพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน metallo-beta-lactamases

Group	Primer name	Primer sequence	Product size
IMP-A	IMP-AF	GTT AAC GGG TGG GGC GTT G	194 bp
	IMP-AR	AGC CAC TCT ATT CCG CCC GT	
IMP-B	IMP-BF	TTG AAG AAG TTA ACG GGT GGG G	556 bp
	IMP-BR	TTT CAA GAG CGA CGC ATC TCC	
IMP-C	IMP-CF	GGT TTG TGG AGC GCG GCT A	463 bp
	IMP-CR	CCT TTA ACA GCC TGT TCC CAT GT	
VIM-D	VIM-DF	TAG CGG TGA GTA TCC GAC AGT	604 bp
	VIM-DR	TGC TTC CGG GTA GTG TTG TTG	
VIM-E	VIM-EF	CCG GTC GGA GAG GTC CGA C	532 bp
	VIM-ER	CCA GAT CGG CAT CGG CCA CG	
	NDM-1F	TAG CCG CTG CAT TGA TGC TGA	571 bp
	NDM-1R	CCA CCA AAA GCG ATG TCG GT	

ตารางที่ 3 PCR condition ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบยีน metallo beta-lactamases

	Denaturation	94 °C		3 min
30 rounds of	Denaturation	94 °C		30 sec
	Annealing	IMP-A, IMP-C, VIM-D	64 °C	30 sec
		IMP-B	62 °C	
		VIM-E	66 °C	
		NDM-1	60 °C	
	Extension	72 °C		30 sec
	Final extension	72 °C		5 min

ในการทดสอบหายีน metallo-beta-lactamase ได้ทำในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดและดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ทั้งชนิดที่มีความไวต่อยาอิมิพีเนมและไม่มีความไวต่อยาอิมิพีเนม โดยผลการทดลองพบว่าในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มีความไวต่อยาอิมิพีเนมไม่ตรวจพบยีน metallo-beta-lactamase แต่ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ไม่มีความไวต่อยาอิมิพีเนมตรวจพบเชื้อที่มียีนทั้งกลุ่ม IMP-type และ VIM-type metallo-beta-lactamase ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



Lane M: 2-log DNA Ladder

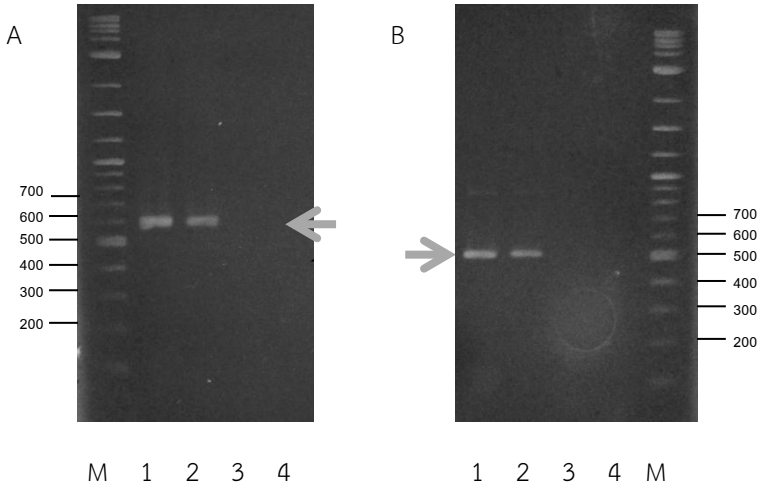
Lane 1 : Positive control of IMP-type metallo-beta-lactamase

Lane 2 : Positive result IMP-C clinically isolated *P. aeruginosa*

Lane 3 : Negative result of IMP-type metallo-beta-lactamase in clinically isolated *P. aeruginosa*

Lane 4 : *P. aeruginosa* PAO1 (Negative control)

ภาพที่ 1 ตัวอย่างผลของ gel electrophoresis ในการตรวจสอบยีน IMP-type metallo-beta-lactamase โดยใช้ primer 3 ชุด คือ IMP-AF และ IMP-AR (A) IMP-BF และ IMP-BR (B) และ IMP-CF และ IMP-CR (C) โดย PCR product ที่ต้องการคือ 194, 556 และ 463 bp ตามลำดับ (ตามลูกศรแสดงในภาพ)



Lane M: 2-log DNA Ladder

Lane 1 : Positive control of VIM-type metallo-beta-lactamase

Lane 2 : Positive result VIM-type metallo-beta-lactamase in clinically isolated *P. aeruginosa*

Lane 3 : Negative result of VIM-type metallo-beta-lactamase in clinically isolated *P. aeruginosa*

Lane 4 : *P. aeruginosa* PAO1 (Negative control)

ภาพที่ 2 ตัวอย่างผลของ gel electrophoresis ในการตรวจสอบยีน VIM-type metallo-beta-lactamase โดยใช้ primer 2 ชุด คือ VIM-DF และ VIM-DR (A) และ VIM-EF และ VIM-ER (B) โดย PCR product ที่ต้องการคือ 604, 532 bp ตามลำดับ (ตามลูกศรแสดงในภาพ)

PCR product ที่ได้ถูกส่งไปหาลำดับเบส โดยผลพบว่ายังไม่สามารถระบุชนิดของ IMP ได้ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ออกแบบชุดแรกใช้เพื่อการตรวจหาอย่างกว้าง จึงจำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์ชุดใหม่เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของยีนและมีความจำเพาะกับยีนที่คาดการณ์มากขึ้น ดังตารางที่ 4 โดยชนิดของยีนที่จะครอบคลุมและสามารถจำแนกจากกันได้ดังตารางที่ 5 โดยได้ปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ดังตารางที่ 6 และส่วนประกอบของ PCR 50 µL คือ ใช้ DNA template ประมาณ 100 ng, 0.4 µM of each primer, 1 mM of dNTPs, 0.5 units of *Taq* DNA polymerase, 1X buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$) หลังจากนั้นเติมน้ำเพื่อปรับปริมาตร

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์เพื่อใช้ในจำแนกชนิดยีน IMP-type metallo-beta-lactamases

Group	Primer name	Primer sequence	Product size
IMP-G	IMP-GF	GCT ACC GCA GCA GAG TCT TT	456 bp
	IMP-GR	CAG GCA ACC AAA CCA CTA CG	
IMP-H	IMP-HF	GGT TGG AGT GTG GTC ACT AAA C	466 bp
	IMP-HR	CCA AAT AGC CAA GAC CGT CC	

ตารางที่ 5 การแบ่งกลุ่มยีนที่สามารถจำแนกได้จากแต่ละชุด primer

Group	**Primer**	**Detectable gene**
IMP-G	IMP-GF	IMP-1, IMP-10, IMP-30, IMP-52
	IMP-GR	
IMP-H	IMP-HF	IMP-14,IMP-14a, IMP-32, IMP-48, IMP-65
	IMP-HR	

ตารางที่ 6 PCR condition ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ไพรเมอร์ในการจำแนกยีน IMP-type metallo beta-lactamases

	Denaturation	94 ºC		3 min
30 rounds of	Denaturation	94 ºC		30 sec
	Annealing	IMP-G, IMP-H	55 ºC	30 sec
	Extension	72 ºC		30 sec
	Final extension	72 ºC		5 min

PCR product ที่ได้ถูกส่งไปหาลำดับเบส จากข้อมูลที่ได้พบว่าในเชื้อ *P. aeruginosa* จากทางคลินิกตรวจไม่พบยีน NDM-1 แต่ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ไม่มีความไวต่อยาอิมิพีเนมตรวจพบยีน พบยีน IMP-1, IMP-13, IMP-14a และ VIM-2 นอกจากนี้แล้วยังตรวจพบยีนที่มีความคล้ายคลึงกับยีน IMP-14a แต่ยังไม่พบลำดับเบสที่ตรงกันจากในฐานข้อมูลของ NCBI แต่อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการยืนยันว่าเป็นยีนใหม่จำเป็นต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมอีก

3.2 การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *nfxB*

ในการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *nfxB* จะใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยได้ออกแบบ primer ให้ครอบคลุมยีน *nfxB* ซึ่งรวมไปถึงส่วน upstream ของยีนด้วยและทำการปรับเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR ที่ใช้ในการทดสอบ

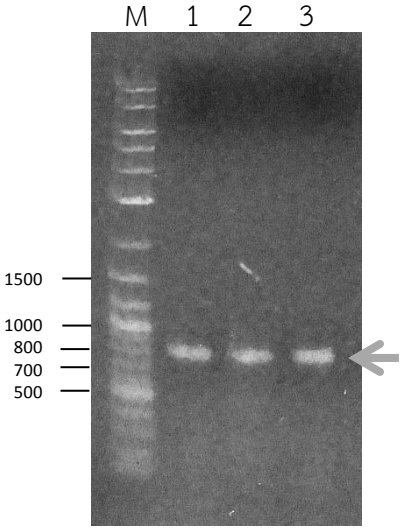
ข้อมูลของยีน *nfxB* นำมาจากฐานข้อมูลของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (เข้าถึงได้จาก http://www.pseudomonas.com/) โดยชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบยีน *nfxB* ดังแสดงในตารางที่ 7 และสภาวะของการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 8 โดย PCR 50 µL คือ ใช้ DNA template ประมาณ 100 ng, 0.4 µM of each primer, 0.4 mM of dNTPs, 0.5 units of Taq DNA polymerase, 1X buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$) หลังจากนั้นเติมน้ำเพื่อปรับปริมาตร และผลการทดลอง PCR ของยีน *nfxB* ดังแสดงในภาพที่ 3

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์เพื่อใช้ในศึกษายีน nfxB

Gene	Primer name	Primer sequence	Product size
nfxB	nfxF	ATT GAA AAC GGA TCG AAT GGT ACT	816 bp
	nfxR	GAC TGA TCT TCC CGA GTG TCG	

ตารางที่ 8 PCR condition ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ไพรเมอร์ในการศึกษายีน nfxB

	Denaturation	95 °C	3 min
30 rounds of	Denaturation	95 °C	30 sec
	Annealing	60 °C	30 sec
	Extension	72 °C	30 sec
	Final extension	72 °C	5 min

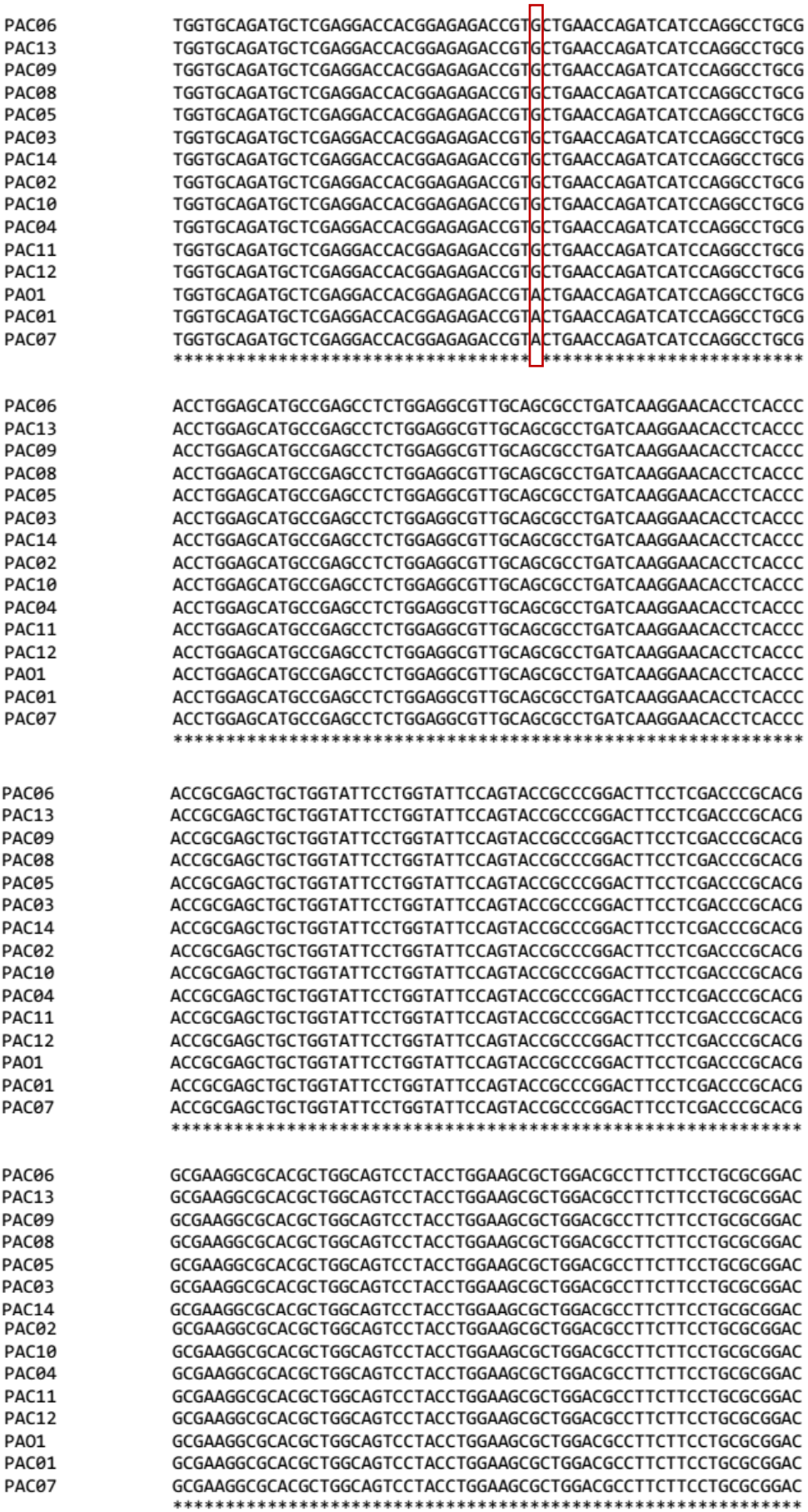


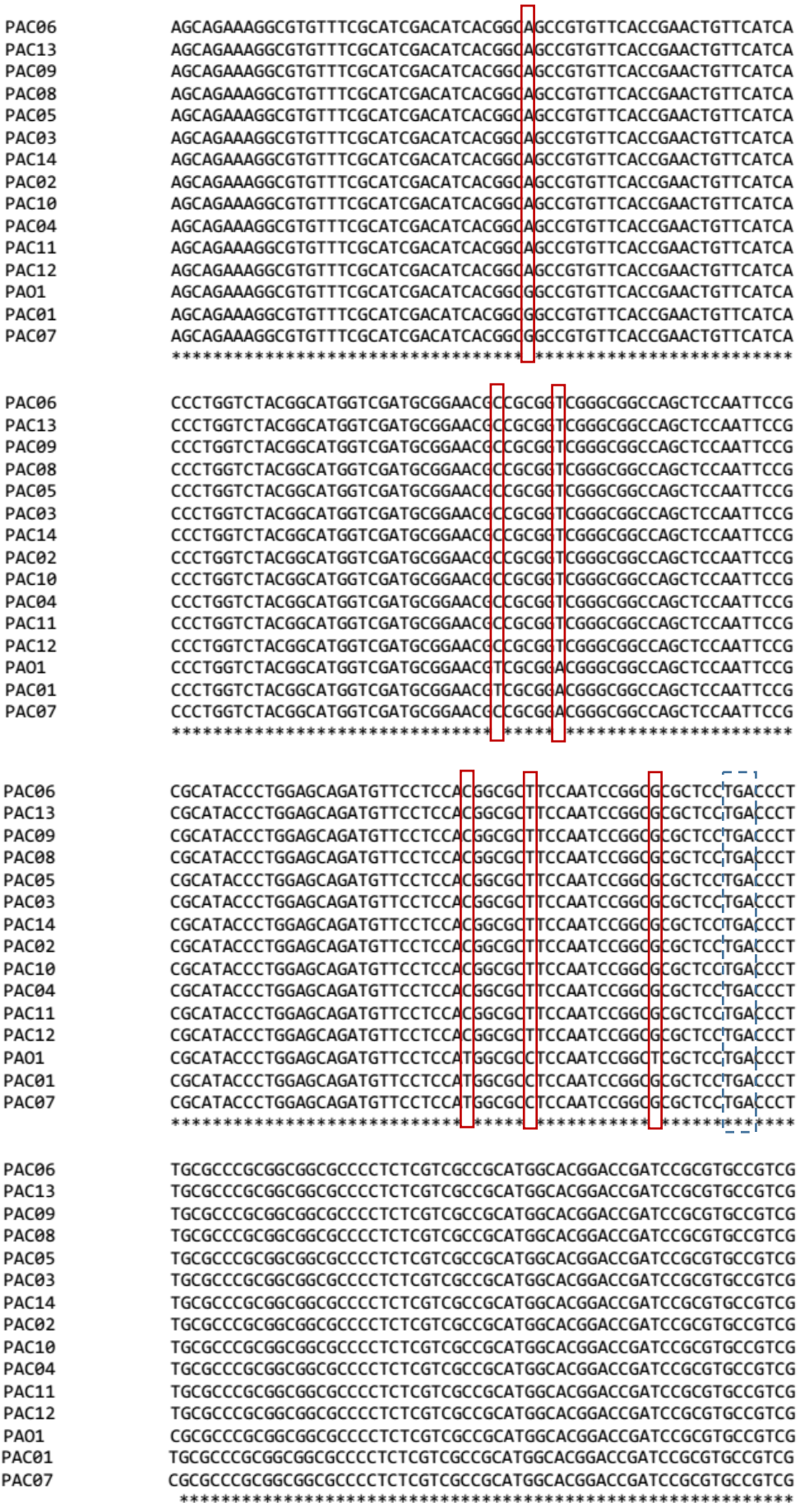
Lane M: 2-log DNA Ladder
Lane 1 : *P. aeruginosa* PAO1
Lane 2 : Clinically isolated *P. aeruginosa* (imipenem susceptible)
Lane 3 : Clinically isolated *P. aeruginosa* (imipenem non-susceptible)

ภาพที่ 3 แสดงผลของ gel electrophoresis ของยีน *nfxB* โดย PCR product ที่ต้องการคือ 816 bp (ตามลูกศรแสดงในภาพ)

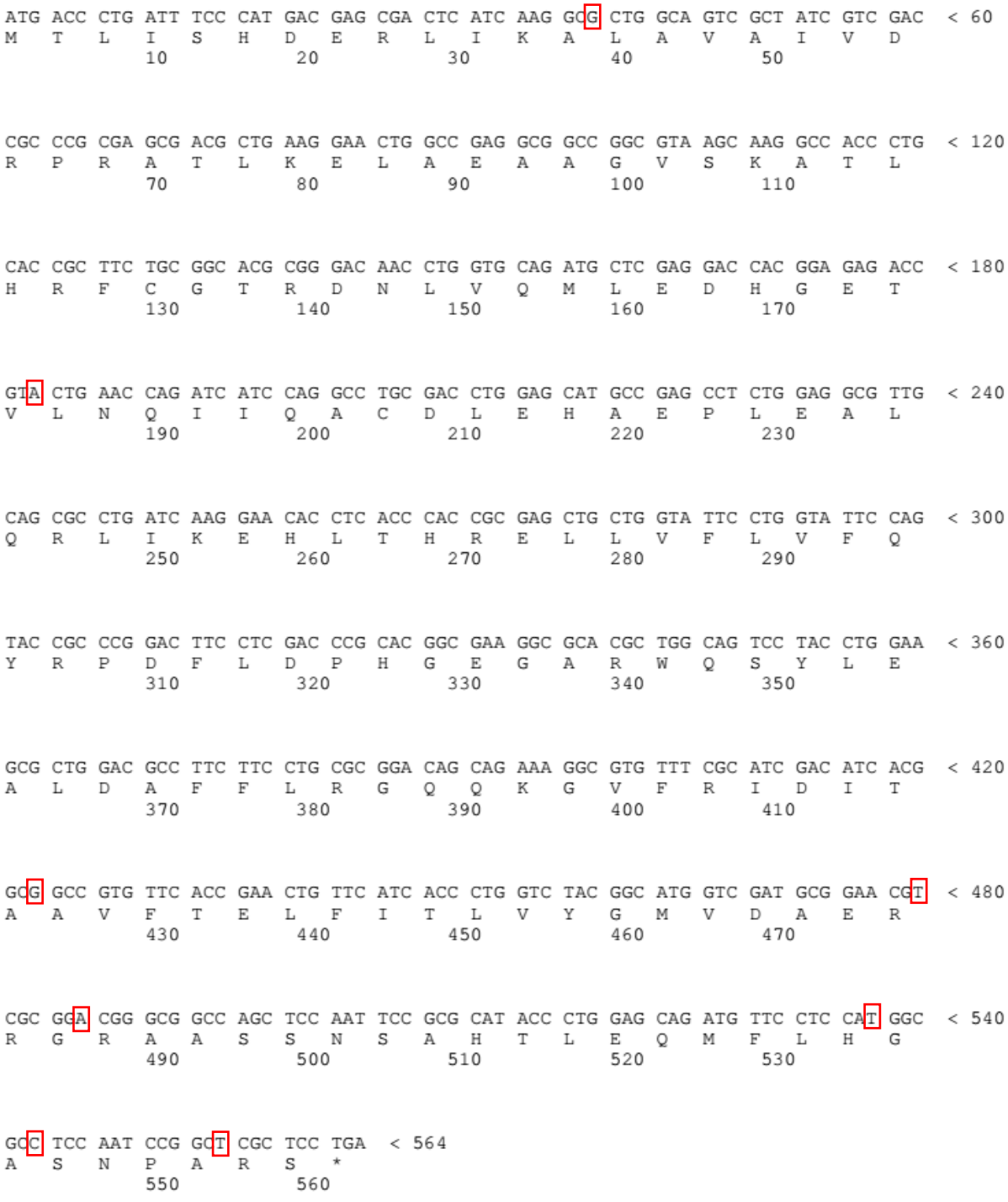
PCR product ของยีน *nfxB* ในเชื้อ clinically isolated *P. aeruginosa* ที่เป็น imipenem susceptible ถูกส่งไปหาลำดับเบส และข้อมูลลำดับเบสได้ถูกนำมาเปรียบเทียบ โดยใช้โปรแกรม Clustal W (เข้าถึงได้ที่ http://www.genome.jp/tools/clustalw/) โดยผลการทำ multiple alignment แสดงดังภาพที่ 4 และได้แสดงรหัส protein ของยีน *nfxB* ในภาพที่ 5 ซึ่งพบว่าลำดับเบสมีการเปลี่ยนแปลงแต่ไม่ได้ส่งผลกระทบกับการแสดงออกยีน *nfxB* เนื่องจากการเปลี่ยนลำดับเบสเกิดในตำแหน่งที่ 3 ของ reading frame และรหัส DNA ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโปรตีน

PAC06 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAGTTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC13 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC09 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC08 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC05 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC03 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC14 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC02 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC10 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC04 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC11 CTCAA-TGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC12 CTCAAATGATCTTTTGTCATCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAO1 CTCAA-TGATCTTTTGACAGCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC01 CTCAAATGATCTTTTGACAGCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC07 CTCAA-TGATCTTTTGACAGCTAATTCCTTTGGACGCGAGGCCAGTTTTCTGCACAATGC
PAC06 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC13 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC09 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC08 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC05 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC03 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC14 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC02 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC10 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC04 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC11 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC12 GCACAATCGGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAO1 GCACAATCAGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC01 GCACAATCAGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC07 GCACAATCAGAAAAACCAACCGGGACCCATCGATGACCCTGATTTCCCATGACGAGCGAC
PAC06 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC13 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC09 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC08 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC05 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC03 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC14 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC02 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC10 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC04 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC11 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC12 TCATCAAGGCACTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAO1 TCATCAAGGCGCTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC01 TCATCAAGGCGCTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC07 TCATCAAGGCGCTGGCAGTCGCTATCGTCGACCGCCCGCGAGCGACGCTGAAGGAACTGG
PAC06 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC13 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC09 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC08 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC05 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC03 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC14 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC02 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC10 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC04 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC11 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC12 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAO1 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC01 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC
PAC07 CCGAGGCGGCCGGCGTAAGCAAGGCCACCCTGCACCGCTTCTGCGGCACGCGGGACAACC


PAC06 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC13 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC09 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC08 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC05 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC03 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC14 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC02 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC10 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC04 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC11 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC12 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTGCTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PA01 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTACTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC01 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTACTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
PAC07 TGGTGCAGATGCTCGAGGACCACGGAGAGACCGTACTGAACCAGATCATCCAGGCCTGCG
****
ACCTGGAGCATGCCGAGCCTCTGGAGGCGTTGCAGCGCCTGATCAAGGAACACCTCACCC
ACCGCGAGCTGCTGGTATTCCTGGTATTCCAGTACCGCCCGGACTTCCTCGACCCGCACG
GCGAAGGCGCACGCTGGCAGTCCTACCTGGAAGCGCTGGACGCCTTCTTCCTGCGCGGAC


PAC06 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC13 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC09 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC08 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC05 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC03 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC14 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC02 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC10 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC04 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC11 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC12 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCAGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PA01 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCGGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC01 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCGGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC07 AGCAGAAAGGCGTGTTTCGCATCGACATCACGGCGGCCGTGTTCACCGAACTGTTCATCA
PAC06 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC13 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC09 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC08 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC05 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC03 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC14 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC02 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC10 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC04 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC11 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC12 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGTCGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PA01 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGTCGCGGACGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC01 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGTCGCGGACGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC07 CCCTGGTCTACGGCATGGTCGATGCGGAACGCCGCGGACGGGCGGCCAGCTCCAATTCCG
PAC06 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC13 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC09 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC08 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC05 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC03 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC14 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC02 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC10 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC04 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC11 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC12 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCACGGCGCTTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PA01 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCATGGCGCCTCCAATCCGGCTCGCTCCTGACCCT
PAC01 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCATGGCGCCTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC07 CGCATACCCTGGAGCAGATGTTCCTCCATGGCGCCTCCAATCCGGCGCGCTCCTGACCCT
PAC06 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC13 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC09 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC08 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC05 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC03 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC14 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC02 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC10 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC04 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC11 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC12 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PA01 CGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC01 TGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG
PAC07 CGCGCCCGCGGCGGCGCCCCTCTCGTCGCCGCATGGCACGGACCGATCCGCGTGCCGTCG

ภาพที่ 4 ผล multiple alignment ของยีน *nfxB* จาก clinical isolated *P. aeruginosa* (PAC01-PAC13) เปรียบเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์มาตรฐาน (PAO1) โดยแสดง start codon และ stop codon ในกรอบเส้นประ (▬) และได้แสดง mutation point ในกรอบเส้นทึบ (▬)



ภาพที่ 5 ลำดับเบสของยีน *nfxB* พร้อม protein sequence โดยแสดงจาก start codon ถึง stop codon และแสดง mutation point ในกรอบเส้นทึบ

3.4 การตรวจสอบยีนยันลำดับเบสของยีน metallo beta-lactamase ชนิดใหม่

ยีน imipenemase ซึ่งมีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกับยีน IMP-14 และคาดว่าเป็น allele ใหม่ถูกนำมาทำ PCR โดยใช้ DNA polymerase ที่เป็น proof reading และส่งไป sequence เพื่อยืนยันลำดับเบสอย่างน้อย 3 ครั้ง

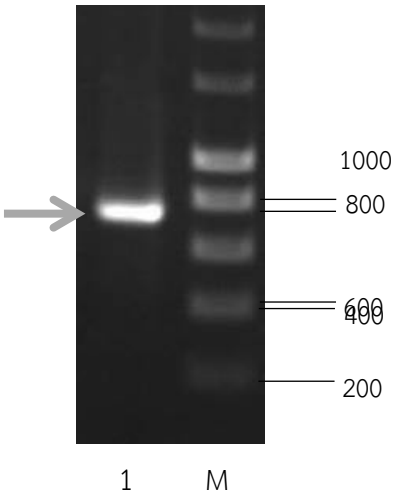
จากนั้นเพื่อให้ได้ลำดับเบสครบจึงออกแบบ Primer ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน allele ใหม่ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่ start codon ถึง stop codon ดังตารางที่ 9 และทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR condition ดังตารางที่ 10 โดย PCR 50 µL คือ ใช้ DNA template ประมาณ 100 ng, 0.4 µM of each primer, 0.4 mM of dNTPs, 1.5 units of KAPA HiFi DNA polymerase, 1X buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$) หลังจากนั้นเติมน้ำเพื่อปรับปริมาตร และผลการทดลอง PCR ของยีน *blaIMP-novel* ดังแสดงในภาพที่ 6

ตารางที่ 9 ไพรเมอร์เพื่อใช้ในศึกษายีน *blaIMP-novel*

Primer	**Nucleotide sequence (5'-3')**	**Product size (bp)**
IMP-NF	ATG AAA AAA TTA TTT GTT TTA TGT	741 bp
IMP-NR	TTA GTC GCT TGG CTG TGA	

ตารางที่ 10 PCR condition ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษายีน *blaIMP-novel*

	Denaturation	95 °C	3 min
30 rounds of	Denaturation	95 °C	30 sec
	Annealing	52 °C	30 sec
	Extension	72 °C	30 sec
	Final extension	72 °C	3 min



Lane M: HyperLadder™ 1 kb

Lane 1 : *P. aeruginosa* clinical isolates carried Novel-IMP type

ภาพที่ 6 ผลของ gel electrophoresis ของยีน IMP ชนิดใหม่ ที่ความเข้มข้น 1.2% agarose โดย PCR product ที่ต้องการคือ 741 bp (ตามลูกศรแสดงในภาพ)

เมื่อได้ PCR product แล้วนำไปโคลนเข้ากับพลาสมิด pGem®-T Easy และทำการส่ง sequence เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง โดยผล sequence ที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับ IMP ชนิดต่างๆ ที่เคยมีรายงานก่อนหน้า (ภาพที่ 7) และพบว่า IMP ชนิดใหม่มีการเปลี่ยนลำดับเบสในตำแหน่งที่ส่งผลให้ชนิดของโปรตีนเปลี่ยนไปดังภาพที่ 8 ดังนั้น IMP ชนิดใหม่จึงถูกส่งเข้าไปที่ NCBI เพื่อขอ allele ใหม่ของยีน imipenemase (ภาคผนวก) ซึ่งได้ allele ใหม่คือ IMP-65

```
blaIMP-NEW      ATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCTTCTGCAACATTGCAGTTGCAGAAGAA
blaIMP-14       ATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCTTCTGCAACATTGCAGTTGCAGAAGAA
blaIMP-14a      ATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCTTCTGCAACATTGCAGTTGCAGAAGAA
blaIMP-32       ATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCTTCTGCAACATTGCAGTTGCAGAAGAA
blaIMP-48       ATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCTTCTGCAACATTGCAGTTGCAGAAGAA
                ************************************************************

blaIMP-NEW      TCTTTGCCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAGAAGGCGTTTATGTTCATACTTCGTTT
blaIMP-14       TCTTTGCCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAGAAGGCGTTTATGTTCATACTTCGTTT
blaIMP-14a      TCTTTGCCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAGAAGGCGTTTATGTTCATACTTCGTTT
blaIMP-32       TCTTTGCCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAGAAGGCGTTTATGTTCATACTTCGTTT
blaIMP-48       TCTTTGCCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAGAAGGCGTTTATGTTCATACTTCGTTT
                ************************************************************

blaIMP-NEW      GAAGAAGTTAAAGGTTGGAGTGTGGTCACTAAACACGGTTTGGTGGTTCTTGTGAAAAAT
blaIMP-14       GAAGAAGTTAAAGGTTGGAGTGTGGTCACTAAACACGGTTTGGTGGTTCTTGTGAAAAAT
blaIMP-14a      GAAGAAGTTAAAGGTTGGAGTGTGGTCACTAAACACGGTTTGGTGGTTCTTGTGAAAAAT
blaIMP-32       GAAGAAGTTAAAGGTTGGAGTGTGGTCACTAAACACGGTTTGGTGGTTCTTGTGAAAAAT
blaIMP-48       GAAGAAGTTAAAGGTTGGAGTGTGGTCACTAAACACGGTTTGGTGGTTCTTGTGAAAAAT
                ************************************************************
```

```
blaIMP-NEW      GACGCCTATCTGATTGATACTCCAATTACTGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTCAATTGG
blaIMP-14       GACGCCTATCTGATTGATACTCCAATTACTGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTCAATTGG
blaIMP-14a      GACGCCTATCTGATTGATACTCCAATTACTGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTCAATTGG
blaIMP-32       GACGCCTATCTGATTGATACTCCAATTACTGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTCAATTGG
blaIMP-48       GACGCCTATCTGATTGATACTCCAACTACTGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTCAATTGG
                ************************* **********************************

blaIMP-NEW      TTTGTTGAGCGGGGCTATAAAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGTGACAGT
blaIMP-14       TTTGTTGAGCGGGGCTATAAAATCAAAGGCAGTATTTCAACACATTTCCATGGTGACAGT
blaIMP-14a      TTTGTTGAGCGGGGCTATAAAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGTGACAGT
blaIMP-32       TTTGTTGAGCGGGGCTATAAAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGTGACAGT
blaIMP-48       TTTGTTGAGCGGGGCTATAAAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGTGACAGT
                ************************************ ********************

blaIMP-NEW      GCGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACATATGCTTCTGAATTAACA
blaIMP-14       ACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACATATGCTTCTGAATTAACA
blaIMP-14a      ACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACATATGCTTCTGAATTAACA
blaIMP-32       ACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACATATGCTTCTGAATTAACA
blaIMP-48       ACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCCCCACATATGCTTCTGAATTAACA
                 ************************************************************

blaIMP-NEW      AATGAACTTCTTAAAAAAGACAATAAGGTACAAGCTAAACACTCTTTTAATGGGGTTAGT
blaIMP-14       AATGAACTTCTTAAAAAAGACAATAAGGTACAAGCTAAACACTCTTTTAATGGGGTTAGT
blaIMP-14a      AATGAACTTCTTAAAAAAGACAATAAGGTACAAGCTAAACACTCTTTTAATGGGGTTAGT
blaIMP-32       AATGAACTTCTTAAAAAAGACAATAAGGTACAAGCTAAACACTCTTTTTATGGGGTTAGT
blaIMP-48       AATGAACTTCTTAAAAAAGACAATAAGGTACAAGCTAAACACTCTTTTAATGGGGTTAGT
                ************************************************ ************

blaIMP-NEW      TATTCACTAATTAAAAACAAAATTGAAGTTTTTTATCCAGGCCCAGGGCACACTCAAGAT
blaIMP-14       TATTCACTAATTAAAAACAAAATTGAAGTTTTTTATCCAGGCCCAGGGCACACTCAAGAT
blaIMP-14a      TATTCACTAATTAAAAACAAAATTGAAGTTTTTTATCCAGGCCCAGGGCACACTCAAGAT
blaIMP-32       TATTCACTAATAAAAAACAAAATTGAAGTTTTTTATCCAGGCCCAGGGCACACTCAAGAT
blaIMP-48       TATTCACTAATTAAAAACAAAATTGAAGTTTTTTATCCAGGCCCAGGGCACACTCAAGAT
                *********** ************************************************

blaIMP-NEW      AACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCG
blaIMP-14       AACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCG
blaIMP-14a      AACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCG
blaIMP-32       AACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCG
blaIMP-48       AACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCG
                ************************************************************

blaIMP-NEW      GACGGTCTTGGCTATTTGGGGGACGCAAATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCTAAAATA
blaIMP-14       GACGGTCTTGGCTATTTGGGGGACGCAAATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCTAAAATA
blaIMP-14a      GACGGTCTTGGCTATTTGGGGGACGCAAATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCTAAAATA
blaIMP-32       GACGGTCTTGGCTATTTGGGGGACGCAAATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCTAAAATA
blaIMP-48       GACGGTCTTGGCTATTTGGGGGACGCAAATTTAGAAGCTTGGCCAAAGTCCGCTAAAATA
                ************************************************************

blaIMP-NEW      TTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTAGTTGTGTCGAGTCATAGTGATATTGGAGAT
blaIMP-14       TTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTAGTTGTGTCGAGTCATAGTGATATTGGAGAT
blaIMP-14a      TTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTAGTTGTGTCGAGTCATAGTGATATTGGAGAT
blaIMP-32       TTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTAGTTGTGTCGAGTCATAGTGATATTGGAGAT
blaIMP-48       TTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTAGTTGTGTCGAGTCATAGTGATATTGGAGAT
                ************************************************************

blaIMP-NEW      GTATCACTCTTGAAACGTACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGCTGAATGAAAGTAAAAAA
blaIMP-14       GTATCACTCTTGAAACGTACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGCTGAATGAAAGTAAAAAA
blaIMP-14a      GTATCACTCTTGAAACGTACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGCTGAATGAAAGTAAAAAA
blaIMP-32       GTATCACTCTTGAAACGTACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGCTGAATGAAAGTAAAAAA
blaIMP-48       GTATCACTCTTGAAACGTACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGCTGAATGAAAGTAAAAAA
                ************************************************************
```

```
blaIMP-NEW      TCATCACAGCCAAGCGACTAA
blaIMP-14       TCATCACAGCCAAGCGACTAA
blaIMP-14a      TCATCACAGCCAAGCGACTAA
blaIMP-32       TCATCACAGCCAAGCGACTAA
blaIMP-48       TCATCACAGCCAAGCGACTAA
                **********************
```

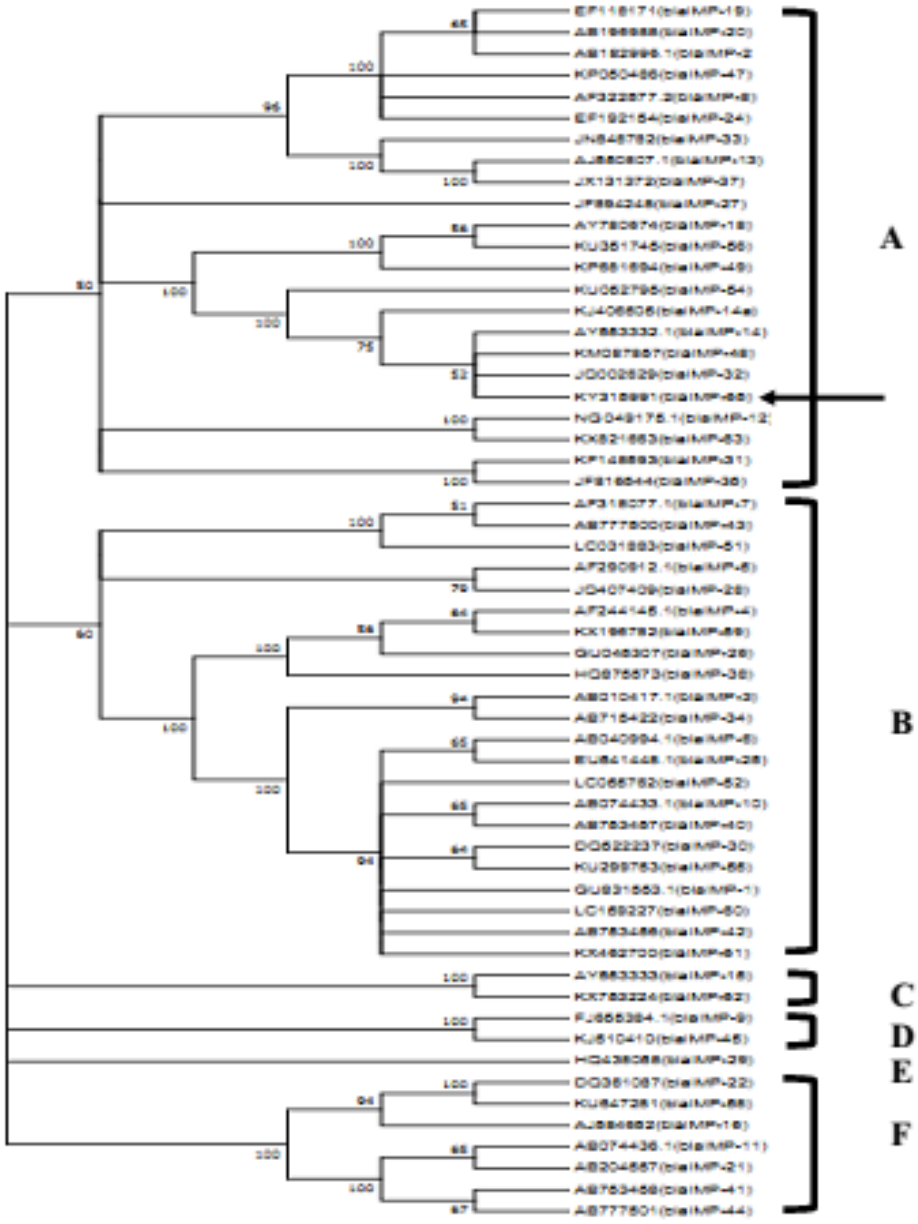
ภาพที่ 7 ลำดับเบสของ IMP ชนิดใหม่เปรียบเทียบกับ IMP ที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันได้แก่ IMP-14, IMP-14a, IMP-32 และ IMP-48 โดยลำดับเบสที่แตกต่างของแต่ละยีนแสดงโดยใช้สีที่แตกต่างกัน

```
IMP-14      MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPLTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-14a     MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPLTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-65      MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPLTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-32      MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPLTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-48      MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPTTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
            ************************************************************** ******************************

IMP-14      TAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-14a     TAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-65      AAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-32      TAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFYGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-48      TAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
            :********************************** ************************************************************

IMP-14      LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
IMP-14a     LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
IMP-65      LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
IMP-32      LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
IMP-48      LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
            *********************************************
```

ภาพที่ 8 ลำดับโปรตีนที่แปลออกมาของยีน IMP ชนิดใหม่เทียบกับ IMP-14, IMP-14a, IMP-32 และ IMP-48 โดยแสดงลำดับโปรตีนที่แตกต่างใช้สีที่แตกต่างกัน

3.5 การเปรียบเทียบความเกี่ยวข้องของยีน imipenemase ชนิดใหม่กับยีนในกลุ่มเดียวกัน

ลำดับเบสของยีน imipenemase ชนิดใหม่และยีนในกลุ่ม imipenemase ที่เคยมีรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบความเกี่ยวข้องกันและสร้างออกมาเป็น phylogenetic tree โดยใช้วิธี Neighbor-Joining โดยใช้ MEGA program version 7.0.26 โดยผลการสร้าง phylogenetic tree ของ IMP ชนิดใหม่แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 phylogenetic tree ของ IMP-type MBLs โดยเปรียบเทียบ IMP-65 (ตามลูกศรแสดงในภาพ) กับ IMP ชนิดอื่นที่เคยมีรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้

3.4 การศึกษาหาการกระจายตัวของเชื้อด้วยวิธี Multilocus sequence typing

เชื้อ *P. aeruginosa* ที่มียีน MBLs และเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็นเชื้อ imipenem hypersusceptible ถูกเลือกมาเป็นตัวแทนเพื่อนำไปศึกษา sequence typing เพื่อดูการระบาดและเป็นการเทียบกับเชื้อ *P. aeruginosa* ในการศึกษาอื่นๆ โดยการหา sequence typing ทำโดยการทำ PCR ยีน 7 ยีน [10] โดยในการทดลองได้ออกแบบ primer ใหม่ 2 คู่สำหรับยีน *mutL* และ *nuoD* (ตารางที่ 11) และทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสม โดย PCR product ที่ได้ของทั้ง 7 ยีนในเชื้อแต่ละตัวถูกส่งไปหาลำดับเบสโดยผลการทำ sequence ที่ได้ถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล MLST จากนั้นเชื้อแต่ละตัวซึ่งประกอบด้วยชุดยีน 7 ยีน จะถูกแปลออกมาเป็น ST ซึ่งบอกถึงโคลนของแต่ละเชื้อ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการศึกษา multilocus sequence typing

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	product size (bp)	Ref
acsA-F acsA-R	ACC TGG TGT ACG CCT CGC TGA C GAC ATA GAT GCC CTG CCC CTT GAT	842	(10)
aroE-F aroE-R	TGG GGC TAT GAC TGG AAA CC TAA CCC GGT TTT GTG ATT CCT ACA	1034	(10)
guaA-F guaA-R	CGG CCT CGA CGT GTG GAT GA GAA CGC CTG GCT GGT CTT GTG GTA	940	(10)
mutL-F mutL-R	AGG TTC GCG ACC TGT TCT T GGA CTC TCC AGC ACG CTC T	688	In this study
nuoD-F nuoD-R	CAC CGA GTT CGA TCC CTA CT GGC ATC CAG TCG AGG AAC T	633	In this study
ppsA-F ppsA-R	GGT CGC TCG GTC AAG GTA GTG G GGG TTC TCT TCT TCC GGC TCG TAG	989	(10)
trpE-F trpE-R	GCG GCC CAG GGT CGT GAG CCC GGC GCT TGT TGA TGG TT	811	(10)

ตารางที่ 12 ผลการศึกษา MLST ของเชื้อ *P. aeruginosa* ของเชื้อที่มีความไวต่อยา imipenem และเชื้อที่ตรวจพบเอนไซม์ metallo beta-lactamase

Strains	MBLs	ST	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE
Standard strain									
PAO1		549	7	5	12	3	4	1	7
Imipenem hypersusceptible *P. aeruginosa*									
MPPA-051		235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-136		235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-241		235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-328		235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-342		235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-222		273	104	4	36	71	4	4	53
MPPA-002		1816	40	5	11	3	4	40	2
Metallo beta lactamases producing *P. aeruginosa*									
MPPA-092	VIM-2	235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-198	VIM-2	235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-213	VIM-2	235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-217	VIM-2	235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-286	IMP-14a	235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-409	VIM-2	235	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-066	IMP-1	964	145	5	26	3	4	4	26
MPPA-068	IMP-1	964	145	5	26	3	4	4	26
MPPA-103	IMP-1	964	145	5	26	3	4	4	26
MPPA-138	IMP-65	111	17	5	5	4	4	4	3
MPPA-155	IMP-65	111	17	5	5	4	4	4	3
MPPA-179	IMP-14a	292	109	10	73	3	4	4	3
MPPA-263	IMP-13	621	15	5	20	5	1	4	25
MPPA-135	VIM-2	1584	38	5	3	13	1	2	4

บทที่ 4
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

ยากลุ่มคาร์บาพีเนม (carbapenems) มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้กว้างทั้งเชื้อกลุ่มแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อไม่ใช้อากาศ นอกจากนี้แล้วยากลุ่ม carbapenems ยังมีคุณสมบัติในการทนต่อเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายยากลุ่ม beta-lactams ได้ยกเว้นเอนไซม์กลุ่ม carbapenemase ซึ่งด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ยากลุ่ม carbapenems เป็นยาที่มีความสำคัญและมักใช้ในการรักษาการติดเชื้อที่รุนแรงซึ่งรวมไปถึงเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter* spp. ด้วย [11] โดยเชื้อ *P. aeruginosa* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สำคัญและมักก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในโรงพยาบาลโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ ในการติดเชื้อที่รุนแรงเช่นการติดเชื้อในกระแสเลือด มักใช้ยากลุ่ม carbapenems ในการรักษา [12] แต่เชื้อ *P. aeruginosa* มีกลไกที่สามารถดื้อต่อยาได้หลายกลไกและยังสามารถรับกลไกการดื้อยาใหม่ๆ เพิ่มเติมได้ผ่านทางการรับ plasmid ที่มียีนดื้อยาเหล่านั้นอยู่ อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงเชื้อมีความไวต่อยาอิมีพีเนมทางคลินิกอยู่บ้าง แต่ยังไม่ทราบถึงกลไกการแสดงออกอย่างแน่ชัด [6]

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับกลไกระดับ molecular สองกลุ่มด้วยกัน โดยในกลุ่มแรกศึกษาเกี่ยวกับยีน *nfxB* ซึ่งมีการรายงานว่าส่งผลต่อการแสดงออกของ efflux pump กลุ่ม *mexCD-oprJ* [7] แต่จากการศึกษาพบว่าเชื้อซึ่งมีความไวต่อยา imipenem พบการเปลี่ยนแปลงของยีน *nfxB* หลายจุดแต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเกิดขึ้นที่เบสลำดับที่ 3 ของชุด codon และไม่ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ของลำดับโปรตีน (silent mutation) จึงพอสรุปได้ว่ายีน *nfxB* ของเชื้อกลุ่มนี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับโปรตีนเมื่อเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *P. aeruginosa* PAO1

ในกลไกกลุ่มที่สองได้ทำการศึกษากลไกเกี่ยวกับเอนไซม์ metallo beta-lactamase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทำลายยากลุ่ม carbapenemase ซึ่งพบมากในเชื้อ *P. aeruginosa* แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์แต่ละชนิดของ metallo beta-lactamase นั้นจะมีความแตกต่างของคุณสมบัติในการทำลายยากลุ่ม beta-lactams ที่แตกต่างกัน โดยมีรายงานว่าเอนไซม์บางชนิดในกลุ่ม metallo beta-lactamase มีความสามารถในการทำลายยา imipenem และยา meropenem ที่แตกต่างกัน [8] ดังนั้นจำเป็นต้องหาชนิดของเอนไซม์ที่พบในเชื้อกลุ่มนี้ โดยการหาเอนไซม์กลุ่ม metallo beta-lactmase นั้นได้ทำการศึกษาในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด ทั้งที่ไวและไม่ไวต่อยา imipenem โดยผลการทดลองไม่ตรวจพบเอนไซม์ metallo beta-lactamase ในเชื้อกลุ่มที่ไวต่อยา imipenem แต่ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ดื้อต่อยาหลายชนิดพบเอนไซม์ metallo beta-lactamase หลายชนิดได้แก่ IMP-1 IMP-13 IMP-14a และ VIM-2 นอกจากนี้แล้วยังพบเอนไซม์ชนิดใหม่ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ IMP-14a แต่มีตำแหน่งของลำดับเบสจาก IMP-14 จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งในลำดับเบสตำแหน่งที่ 301 ที่มีการเปลี่ยนแปลงจาก Adenine (A) เป็น Guanine (G) ส่งผลให้โปรตีนในตำแหน่งที่ 101 เปลี่ยนแปลงจาก Threonine (T) เป็น Alanine (A) ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้สามารถนำลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวไปขอ Allele ชนิดใหม่ของยีนในกลุ่ม IMP ได้

ซึ่งได้รับการระบุเลขของลำดับยีนใหม่เป็น IMP-65 นอกจากนี้แล้วยีนที่ใกล้เคียงกลุ่ม IMP-14 ยังประกอบด้วย IMP-32 และ IMP-48 ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่ายีนกลุ่มดังกล่าว (IMP14 and variants) นั้นพบเฉพาะเชื้อจากในประเทศไทย [13-16] เมื่อนำลำดับเบสของเอนไซม์กลุ่มดังกล่าวไปหาความสัมพันธ์กับเอนไซม์ imipenemase ชนิดอื่นที่เคยมีรายงานมาก่อนพบว่าลำดับเบสของเอนไซม์ imipenemase กลุ่มนี้ มีความแตกต่างกับเอนไซม์ IMP-1 ค่อนข้างมาก โดยมีความแตกต่างประมาณ 15% ซึ่งเอนไซม์ IMP-1 เป็นเอนไซม์ที่มีการพบการระบาดเด่นในทวีปเอเชียโดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น [9] นอกจากนี้แล้วในตัวอย่างที่นำมาศึกษาพบว่าเอนไซม์ metallo beta-lactamase ที่พบมากที่สุดคือ VIM-2 ตามมาด้วย IMP-1 และ IMP-14 and variants ในจำนวนที่เท่ากัน ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าเอนไซม์ imipenemase กลุ่ม IMP-14 and variants อาจจะเป็นเอนไซม์ซึ่งพบเด่นเฉพาะในประเทศไทย

เมื่อนำเชื้อจากทั้งสองกลุ่มมาศึกษาดูการกระจายตัวโดยเปรียบเทียบในเชื้อทั้งสองกลุ่มโดยใช้วิธี multilocus sequence typing (MLST) ซึ่งในประเทศไทยยังมีการศึกษาเกี่ยวกับ ST ของเชื้อ *P. aeruginosa* เพียงไม่กี่สายพันธุ์โดยพบเพียง ST235 และ ST260 [17, 18] ซึ่งในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้เพิ่มตัวอย่างในการศึกษาและเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิด โดยผลการศึกษาพบว่า ST ที่เด่นในเชื้อทั้งสองกลุ่มเป็น ST235 ซึ่งสอดคล้องกับหลายๆ การศึกษาที่พบว่า ST เด่นของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่พบทั่วโลกคือ ST235 [19] นอกจากนี้ในงานวิจัยดังกล่าวยังระบุอีกด้วยว่า ST111 และ ST175 ถือเป็น ST ที่สำคัญที่พบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศแถบยุโรป [19] โดยในงานวิจัยนี้ พบเชื้อที่เป็น ST111 โดยเป็นเชื้อที่มียีน IMP ชนิดใหม่ด้วย นอกจากนี้แล้ว ST111 ยังไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทย แม้แต่ในทวีปเอเชียก็ยังมีรายงานไม่มากนัก ผู้วิจัยยังพบอีกว่า ST964 ซึ่งถือเป็น ST ที่พบมากเป็นลำดับ 2 โดย ST964 ไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทยมาก่อน แต่เคยมีรายงานจากประเทศสิงคโปร์และสหราชอาณาจักร [20, 21] นอกจากนี้แล้ว ST273, ST292, ST621, ST1584, และ ST1816 ยังไม่เคยมีรายงานจากประเทศไทยเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ST621, ST1584, และ ST1816 สืบค้นไม่พบรายงานจากประเทศในทวีปเอเชีย และเป็นที่น่าสนใจว่าในการศึกษานี้พบ เชื้อที่เป็น ST621 และมียีน IMP-13 เช่นเดียวกับหลายรายงานทั่วโลก[22] แต่เนื่องจากข้อมูลแหล่งที่มาของเชื้อมีเพียงภาคที่ได้รับตัวอย่างจึงไม่สามารถตรวจสอบหาประวัติของเชื้อสายพันธุ์นี้ได้ จากข้อมูลเหล่านี้อาจจะพอสรุปได้ว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่เป็นสายพันธุ์สำคัญในการก่อโรคคือ ST235 และแนวโน้มของสายพันธุ์อื่นๆ มีความแตกต่างระหว่างประเทศในทวีปยุโรปและประเทศในทวีปเอเชีย

ในงานวิจัยนี้ตรวจพบยีน imipenemase ชนิดใหม่และอาจบ่งชี้เอนไซม์ imipenemase กลุ่ม IMP-14 and variants ซึ่งมีลักษณะเด่นในประเทศไทย นอกจากนี้การศึกษา MLST ยังบ่งชี้ว่า ST235 คือ ST เด่นในประเทศไทย และยังพบ ST อื่นอีกหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศมาก่อน นอกจากนี้ยังอาจบ่งชี้ได้ว่าการกระจายตัวของ ST ในประเทศไทยมีความแตกต่างจากประเทศในแถบยุโรป แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาลักษณะการแสดงออกของเอนไซม์ IMP-14 and variants ซึ่งเป็นเอนไซม์เด่นในประเทศไทย โดยผู้วิจัยคาดว่าจะทำการศึกษาลักษณะการแสดงออกของเอนไซม์กลุ่มนี้ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Santajit, S. and N. Indrawattana, Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*, 2016. 2016:2475067.
2. Papp-Wallace, K.M., A. Endimiani, M.A. Taracila*, et al.*, Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011. 55(11):4943-4960.
3. Zhanel, G.G., R. Wiebe, L. Dilay*, et al.*, Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 2007. 67(7):1027-52.
4. Mesaros, N., P. Nordmann, P. Plesiat*, et al.*, *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*, 2007. 13(6):560-78.
5. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017; Available from: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/.
6. Wolter, D.J., N.D. Hanson and P.D. Lister, AmpC and OprD are not involved in the mechanism of imipenem hypersusceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates overexpressing the mexCD-oprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. 49(11):4763-6.
7. Masuda, N., N. Gotoh, S. Ohya*, et al.*, Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. 40(4):909-13.
8. Tada, T., T. Miyoshi-Akiyama, K. Shimada*, et al.*, IMP-43 and IMP-44 metallo-beta-lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. 57(9):4427-32.
9. Cornaglia, G., H. Giamarellou and G.M. Rossolini, Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*, 2011. 11(5):381-93.
10. Curran, B., D. Jonas, H. Grundmann*, et al.*, Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 2004. 42(12):5644-9.
11. Kattan, J.N., M.V. Villegas and J.P. Quinn, New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect*, 2008. 14(12):1102-11.

12. Walsh, T.R., Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis*, 2008. 21(4):367-71.
13. Kazmierczak, K.M., S. Rabine, M. Hackel*, et al.*, Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016. 60(2):1067-78.
14. Piyakul, C., R. Tiyawisutsri and K. Boonbumrung, Emergence of metallo-beta-lactamase *IMP*-14 and *VIM*-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a tertiary-level hospital in Thailand. *Epidemiol Infect*, 2012. 140(3):539-41.
15. Rimrang, B., A. Chanawong, A. Lulitanond*, et al.*, Emergence of *NDM*-1- and *IMP*-14*a*-producing Enterobacteriaceae in Thailand. *J Antimicrob Chemother*, 2012. 67(11):2626-30.
16. Prombhul, S., C. Tribuddharat, P. Laikijrung*, et al.*, New variant of an imipenemase, *IMP*-32, in *Klebsiella pneumoniae* from a fatal case of a Thai patient. *J Med Microbiol*, 2016. 65(6):572-3.
17. Kim, M.J., I.K. Bae, S.H. Jeong*, et al.*, Dissemination of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of sequence type 235 in Asian countries. *J Antimicrob Chemother*, 2013. 68(12):2820-4.
18. Samuelsen, O., M.A. Toleman, A. Sundsfjord*, et al.*, Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. 54(1):346-52.
19. Oliver, A., X. Mulet, C. Lopez-Causape*, et al.*, The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*, 2015. 21-22:41-59.
20. Koh, T.H., C.T. Khoo, T.T. Tan*, et al.*, Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo-beta-lactamase genes, including the novel bla(*IMP*-26) gene. *J Clin Microbiol*, 2010. 48(7):2563-4.
21. Wright, L.L., J.F. Turton, K.L. Hopkins*, et al.*, Genetic environment of metallo-beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*, 2015. 70(12):3250-8.
22. Santella, G., S. Pollini, J.D. Docquier*, et al.*, Intercontinental dissemination of IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging in sequence type 621. *J Clin Microbiol*, 2010. 48(11):4342-3.

ภาคผนวก

จดหมายตอบรับการได้รับ Allele IMP-65 จาก NCBI

Mahidol University

Piyatip Khuntayaporn <piyatip.khn@mahidol.edu>

GenBank KY315991 (blaIMP-65)
1 message

gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov <gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov> Wed, Dec 14, 2016 at 4:44 AM
To: piyatip.khn@mahidol.ac.th

Dear GenBank Submitter:

Thank you for your submission. Your sequence has been assigned the allele blaIMP-65.

Based on the data submitted to us, the scheduled release date for your submission is:

Oct 23, 2020

However, if the accession number is published prior to that date, the sequence will be released upon publication.

Note that the entire sequence will be released when the article citing this accession number is published or on the above release date, whichever comes first. If this is not what you intended, please notify us immediately so that we can discuss your submission in more detail.

If this date is not correct, please let us know as soon as possible, otherwise this submission will be released on the date indicated above. The data will become available from our different servers within a few days of release. The data are simultaneously made available to ENA in Europe and the DNA Data Bank of Japan.

Minor changes may have been made to your original submission in order to conform to database annotation conventions. In particular, please review:

- Spelling
- Citation data (page span, etc.)
- Nomenclature ('official' gene names, product labels, etc.)
- Taxonomic and source data
- Feature spans and descriptions (particularly non-coding regions)

Additional edits may have been made to your submission, including:

- Exon spans adjusted to conform to the splice donor/acceptor consensus sequences, GT and AG, respectively
- Strings of N's at the ends of sequences and linker past the polyA tail removed
- Any mRNA or ribosomal RNA sequences submitted on the minus-strand have been reverse-complemented

If your submission contained unpublished organism names, the scientific

names have been changed to temporary names. Please notify us when the organism names are published and we will update them accordingly.

Please send any revisions, including bibliographic information (e.g., conversion from unpublished to published), biological data (e.g., new features), or sequence data to:

gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov

Since the flatfile record is a display format only and is not an editable format of the data, do not make changes directly to a flatfile. For complete information about different methods to update a sequence record, see: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/update.html

An accession number has been assigned to each nucleotide sequence and was previously provided to you. Note that during the processing, we have assigned protein identifiers to any proteins within the submission. This is fielded as /protein_id.

We strongly recommend that these numbers appear in any publication which reports or discusses these data, so that readers may easily retrieve your data from our databases.

Thank you once again for your submission.

Please reply using the original subject line.
This will allow for faster processing of your correspondence.

Sincerely,

DeAnne Olsen Cravaritis, Ph.D.
GenBank Direct Submission Staff
gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov

GenBank flat file:

LOCUS KY315991 741 bp DNA linear BCT 13-DEC-2016
DEFINITION Pseudomonas aeruginosa strain MPPA-138 subclass B1 metallo-beta-lactamase IMP-65 (blaIMP) gene, blaIMP-65 allele, complete cds.
ACCESSION KY315991
VERSION KY315991
DBLINK BioSample: SAMN06127778
KEYWORDS .
SOURCE Pseudomonas aeruginosa
ORGANISM Pseudomonas aeruginosa
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.
REFERENCE 1 (bases 1 to 741)
AUTHORS Khuntayaporn,P., Yamprayoonswat,W., Yasawong,M. and Chomnawang,M.T.
TITLE Characterization of Metallo Beta-lactamase in Thailand
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 741)
AUTHORS Khuntayaporn,P., Yamprayoonswat,W., Yasawong,M. and Chomnawang,M.T.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (09-DEC-2016) Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, 447 Sri-Ayuthya Rd., Ratchathewi,

```
          Bangkok 10400, Thailand
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
          Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
          ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..741
                     /organism="Pseudomonas aeruginosa"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="MPPA-138"
                     /db_xref="taxon:287"
     gene            1..741
                     /gene="blaIMP"
                     /allele="blaIMP-65"
                     /note="IMP-65"
     CDS             1..741
                     /gene="blaIMP"
                     /allele="blaIMP-65"
                     /note="IMP-65"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="subclass B1 metallo-beta-lactamase IMP-65"
                     /protein_id="APM84539"
                     /translation="MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVK
                     GWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPITAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDSAA
                     GIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQD
                     NVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSDI
                     GDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD"
ORIGIN
        1 atgaaaaaat tatttgtttt atgtgtattc ttcttctgca acattgcagt tgcagaagaa
       61 tctttgcctg atttaaaaat tgagaagctt gaagaaggcg tttatgttca tacttcgttt
      121 gaagaagtta aaggttggag tgtggtcact aaacacggtt tggtggttct tgtgaaaaat
      181 gacgcctatc tgattgatac tccaattact gctaaagata ctgaaaaatt agtcaattgg
      241 tttgttgagc ggggctataa aatcaaaggc agtatttcca cacatttcca tggtgacagt
      301 gcggctggaa tagagtggct taattctcaa tctatcccca catatgcttc tgaattaaca
      361 aatgaacttc ttaaaaaaga caataaggta caagctaaac actcttttaa tggggttagt
      421 tattcactaa ttaaaaacaa aattgaagtt ttttatccag gcccagggca cactcaagat
      481 aacgtagtgg tttggttacc tgaaaagaaa attttattcg gtggttgctt tgttaaaccg
      541 gacggtcttg gctatttggg ggacgcaaat ttagaagctt ggccaaagtc cgctaaaata
      601 ttaatgtcta aatatggtaa agcaaaacta gttgtgtcga gtcatagtga tattggagat
      661 gtatcactct tgaaacgtac atgggagcag gctgttaaag ggctgaatga aagtaaaaaa
      721 tcatcacagc caagcgacta a
//
```

(Submitted manuscript [in process])

Dissemination of carbapenem-resistance among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase genes, including the novel *bla*(IMP-65) gene in Thailand

Wariya Yamprayoonswat[a], Montri Yasawong[b], Mullika Traidej Chomnawang[a] and Piyatip Khuntayaporn[a]#

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand[a], The Chulabhorn Graduate Institute, Bangkok, Thailand[b]

Running title: Dissemination of CR-MDR *P. aeruginosa* carried MBLs

#Address correspondence to Piyatip Khuntayaporn,
Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University
447 Sri-Ayuthya Rd. Rajchathevee
Bangkok, Thailand, 10400
Phone: (+66)81-407-4239
E-mail: piyatip.khn@mahidol.edu

Abstract

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. Metallo-beta-lactamase (MBL) production is one of the most important carbepenems resistance mechansims and usually related with nosocomial infections caused by *P. aeruginosa*. This study was aimed to determine MBL genes and dissemination pattern of MBL producing *P. aeruginosa* strains. Specific primers were designed to detect MBL genes which include IMP-, VIM-, and NDM-MBL genes. IMP-1, IMP-13, IMP-14a and VIM-2 were detected in this study. Moreover, novel IMP-type MBLs was discovered and emphasized unique group of MBLs. Multilocus sequence typing method was used to determine dissemination pattern of CR-MDR *P. aeruginosa*. ST235 was detected in both MBL harboring and non-haboring strains. 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* in Asia.

Keywords

Pseudomonas aeruginosa, Metallo beta-lactamase, Multilocus sequence typing, IMP-65

Introduction

Beta-lactams is a very large drug group which about half of antibiotics use nowadays. Mechanism of beta-lactams agents is bactericidal which inhibit synthesis process of peptidoglycan of bacteria cell wall. However, bacteria can mutate and escape from beta-lactams by many mechanisms. One of the most prevalence resistance mechanisms against beta-lactams in Gram-negative bacteria is production of enzymes which can destroy these agents. These enzymes are known as beta-lactamases and can be categorized into many subgroups such as penicillinases, cephalosporinases and extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) (1). Fortunately, most of beta-lactamases cannot hydrolyze carbapenems which made them concerned as the last resort of treatment.

However, since 1980s, enzyme that could destroy carbapenems was discovered and concerned as a threat (2). This enzyme was called imipenemase and catergorized as metallo-beta-lactamase (MBL). MBLs are belong to class B beta lactamase which can hydrolyze all beta-lactams except monobactams (1). MBLs cannot inhibit by any commercially beta lactamase inhibitors but metal chelating agents such as EDTA could inhibit the activity of class B enzyme (1).

Increasing of antibiotic resistance situations has raised an awareness around the world. ESKAPE is a group of bacteria which has been recognized as threats of this century (3). *Pseudomonas aeruginosa* is also belonged in this group because its resistance mechanisms such as efflux pumps, loss of porins and production of beta-lactamase enzymes (4). MBLs was also one of resistance mechanisms that frequent found in *P. aeruginosa* especially in severe infection.

Eventhough, MBLs producing *P. aeruginosa* had been isolated in Thailand. Only few studies has been performed multilocus sequence typing (MLST) of MBL-producing *P.*

aeruginosa in Asia. Only 1 study have been identified *P. aeruginosa* isolates of sequence type (ST) 235 harbouring VIM-2 in Thailand. The objective of this study was to investigate the dissemination traits of *P. aeruginosa* harboring MBLs including novel type of MBLs, IMP-65, collected from hospitals across Thailand.

Results

Detection of *integronI* and metallo beta-lactamase genes

All CR-MDR *P. aeruginosa* were detected for phenotypic screened by paper diffusion method and detected for *intI* gene by PCR method. One hundred and thirty four (88.74%) clinical isolates of *P. aeruginosa* were positive for *int1* gene. One hundred and four clinical isolates (67.97%) of CR-MDR *P. aeruginosa* were positive by CDT and/or DDST. These strains were submitted for metallo beta-lactamase genes detection by PCR method. Total of 31 (20.26%) clinical isolates of *P. aeruginosa* were detected metallo-beta-lactamase gene by PCR method which can be divided into VIM-type primer for 14 strains and IMP-type primer for 17 strains. In VIM-type primers, all 14 strains were detected by VIM-D primer but only 9 strains were also detected by VIM-E. All VIM-D PCR products were sequenced and identified as VIM-2. In IMP-type primers, all 17 strains were detected by IMP-C primer. Among those, seven strains were detected by any IMP-type primers. All IMP-C PCR products were submitted for sequencing. However, sequencing results could not determine specific type of IMP genes. Therefore, those strains were amplified with IMP-G, IMP-H and IMP-13 primers to identify specific type of IMP-MBLs. PCR products were sequenced and found IMP-1, IMP-14 and IMP13 harboring strains for 8, 6 and 1 strains, respectively. However, two strains were unidentified. Therefore, IMP-14 primer were designed based on IMP-14 sequence because new

allele of MBLs present high similarity sequences to *blaIMP-14*. Novel gene was assigned as IMP-65 by NCBI. Dissemination of MBL genes detected in *P. aeruginosa* across Thailand was showed in Figure 1.

Novel IMP-type

Translated protein sequences of IMP14, IMP-14a, IMP-32, IMP-48 and IMP-65 were compared as showed in Figure 2. These sequences presented high similarity with one or two amino acids change. Moreover, phylogenetic tree of IMP-type MBLs was created to analyse evolution of IMP-65 against others IMP-type MBLs as showed in Figure 3.

MLST profile analysis

Eleven clinical isolates of MDR *P. aeruginosa* in Thailand were identified as ST235 based on MLST results. Among those, six clinical isolates were MBLs-producing *P. aeruginosa* which harbored VIM-2 for 5 clinical isolates and only one isolate harbored IMP-14a. All IMP-1 producing isolates were identified as ST964. Moreover, both IMP-65 harbored *P. aeruginosa* were characterized as ST111. Others MBLs harboring *P. aeruginosa* were identified as ST292, ST621 and ST1584 which was found only one clinical isolate each. Interestingly, most of VIM-2 carrying *P. aeruginosa* were identified as ST235 but one isolate was identified as ST1584. Among non-harbored MBL gene CR-MDR clinical isolates, ST235 was also identified as a dominant type. ST273 and ST1816 were also identified in this non-harbored MBLs group. It noteworthy that ST235 was found as dominant ST (52.38%) in Thailand followed by ST964 (14.29%) and ST111 (9.52%). ST292, ST273, ST621, ST1584 and ST1816 were found only in one clinical isolate each.

Discussion

Detection of metallo beta-lactamases producing microorganisms is quite a challenging. Several phenotypic methods such as, double disc synergy test and combine disk test have been proposed by many researches and have been used for preliminary MBL detection (5, 6). These methods were based on susceptibility of MBL to antibiotics and properties of MBL that required zinc ions at active site for hydrolysis beta-lactam antibiotics (1). Recently, new method, Carba-NP test were introduced (7). Carba-NP test is a fast and easy method. However, many rural area in many countries are still not familiar with the procedure and cost. Hence, the confirmation method using paper disc diffusion principle is more preferred (8). EUCAST also recommend many phenotypic method such as, DDST and CDT which also able to identify type of enzyme for epidemiology control (9, 10).

In our study, clinical isolates were phenotypic screened by paper disc diffusion, DDST and CDT. Many of clinical isolates were interpreted as positive. IntegronI which always related with many antibiotic resistance mechanisms was also found in most of tested clinical isolates. These might indicated that those CR-MDR clinical isolates might carried many antibiotic resistance mechanisms such as, loss of OprD, multiple efflux pumps, or antibiotic inactivating enzymes and could be affected the phenotypic screening method. However, all positive phenotypic screened were further identified for specific type of MBLs.

Most prevalence MBLs belong to IMP- and VIM- type in *P. aeruginosa*. However, one of the most recent discovered MBLs, the NDM-type was also discovered worldwide (11). In our studies, we were discovered IMP-1, IMP-13, IMP-14a, VIM-2 and a novel MBLs, IMP-65.

Previously reported of VIM-type MBLs in Thailand were VIM-2, VIM-5 and VIM-45 (12). In this study, we found only VIM-2 but these clinical isolates were collected from tertiary hospitals located in different parts of Thailand. This might indicated that VIM-2 MBLs was a major player in VIM-type MBLs in Thailand.

Some previous reports showed varies IMP-type in Thailand contained with IMP-1, IMP-13, IMP-14, IMP-14a IMP-32 and IMP-48 (12-16). In this study, many IMP-type MBLs, IMP-1, IMP-13, IMP-14a, and IMP-65 were identified. The results also indicated that IMP-1 and IMP-14a might be dominant types of IMP-MBLs in Thailand. Novel IMP-type MBLs, IMP-65, was demonstrated an amino acid changed from IMP-14 at the 101st position from alanine to threonine. There were also some IMP-type, IMP-32 and IMP-48, which presented similar sequences with IMP-65 and IMP-14. Moreover, IMP-14, IMP-14a, IMP-32, IMP-48 and IMP-65 were never reported in any clinical isolate from other countries than Thailand. These might indicated that IMP-14 and variants were localize and also dominant in Thailand.

Acquired MBL genes were always found within class I integrons which usually carried other additional resistance genes and also known as a gene cassette (17). *Integron I* is an important mechanisms that bacteria used in transfer resistance mechanisms. Most of *integron I* is always found carried within transposons which help the bacteria to transfer antibiotic resistance gene from one to another (17). In our study, we also found that most of MDR *P. aeruginosa* were carried *integron I* gene. Moreover, All MBLs harbored *P. aeruginosa* except one strain (96.55%) were also carried *integron I* gene which was similar to many previous studies (18, 19).

The phylogenetic tree represented evolution of IMP type. This tree have 6 groups are group A, B, C, D, E and F. Group A contained many IMP-types including IMP-13, IMP-14, IMP-14a, IMP-36, IMP-48. Novel IMP-65 was demonstrated close evolution with group A IMP-

type. Other dominant IMP-type in Thailand, IMP-1 was located in group B. Pairs of primers in this study were designed to bind different alleles of IMP-MBLs. The results showed that all IMP-type MBLs in Thailand were detected by IMP-C primers which were designed to detect all previously report IMP-type in Thailand but it was unable to distinguished specific alleles of IMP-type in Thailand. From these results, this set of primer may be used as molecular confirmation test to detect dominant type of IMP-MBLs for epidemiology control in Thailand.

ST235 was identified as a dominant ST in Thailand. Moreover, we also found that ST964 was also presented as a significant ST type among MBL-harbored *P. aeruginosa*. However, this study was emphasized that ST235 was the dominant ST in Thailand when compared the results with previous studies (20, 21). In Kim *et al*, they studied dissemination of carbapenemase *P. aeruginosa* but only a few clinical isolates from Thailand were included and showed only ST235 (20). Another ST from Thailand is ST260 which was detected in *P. aeruginosa* harbored IMP-14 (21).

ST235, ST111 and ST175 are high-risk clones which now concerned as majority of *P. aeruginosa* clinical isolates (22). However, in Asian countries, we found only a few ST111 (23, 24). In this study, ST111 was identified but ST175 was undiscovered. In our study, ST111 were also carried novel IMP-type MBLs, IMP-65. These finding was quite interesting since ST111 occasionally found in Asia and IMP-65 or similar IMP-types never reported in other places than Thailand. Unfortunately, the information about those strains cannot retrieved other than the location of the collection.

ST273, ST292, ST621, ST964, ST1584, and ST1816 were also never been reported in Thailand before. ST 964, the second most ST in this study, were reported in Singapore and UK (25, 26). Those stains of ST964 in Singapore were also carried IMP-1 as found in our study.

ST292 was another ST which were reported in Asia countries, China and Korea (27, 28). However, we cannot find any report of ST621, ST1584, and ST1816 in Asia. It was interesting that we found ST621 which always carrying IMP-13 as same as many countries (29). From these results, it might indicate the different dissemination trait from European countries which identified a lot of ST111 and ST175. However, the larger groups of samples may be required to gain more data.

Conclusion

In conclusion, we were found that VIM-2 and IMP-1 were dominant MBL genes in Thailand and we also able to identify novel IMP, IMP-65. The novel gene was emphasized on dominant localize MBLs, IMP-14 and variants. Our study also emphasized on ST235 as a dominant STs of *P. aeruginosa*. However, we might able to indicate some different ST pattern between Asian countries and other continents.

Material and methods

1. Bacterial culture collection

Carbapenems-resistance *P. aeruginosa* clinical isolates were collected in 2007-2009 from patient in five regions of Thailand. A total of 151 *P. aeruginosa* clinical isolates was characterized as carbapenems resistance among multidrug resistance (CR-MDR). Multidrug resistance (MDR) criteria in this study was defined as non-susceptible to at least 3 of 5 drug groups which used in *Pseudomonas* infection treatment (30). Carbapenems resistance (CR) was defined by being non-susceptible to at least one carbapenem.

2. Phenotypic screening for metallo beta-lactamase

Phenotypic screening for metallo-beta-lactamase (MBL) enzyme was performed by paper diffusion method which divided into 2 major methods which were double-disk synergy test (DDST) and combine disk test (CD) using EDTA as metallo beta-lactamase inhibitor (5).

3. Detection of *integronI* gene

All CR-MDR *P. aeruginosa* were submitted for *integron1* detection by PCR method. The specific primers, Int1-F and Int1-R, of *integron1* gene were used as previously described (31).

4. Genotypic detection of metallo beta lactamase gene

Metallo beta-lactamase genes were divided into 3 groups for IMP-MBLs and 2 groups for VIM-MBLs depended on genotypic relationship of metallo-beta-lactamase genes (11). Each set of primers were designed to detect MBL genes in each groups (Table 1). IMP-1 and VIM-2 were used as control. Whole-cell lysates obtained from clinical isolates were used as DNA templates

for bla_{IMP} and bla_{VIM} detection by PCR method. All IMP-type PCR products were further identified for specific types of IMP-gene by PCR with IMP-G, IMP-H and IMP-13. All PCR products were submitted for sequencing. Nucleotide sequences were compared with sequence databases using BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

5. Amplification of new allele of IMP-MBL

IMP-N primers were designed for a full gene amplification. IMP-14 was used as template because new allele of MBLs present high similarity sequences to *blaIMP-14*. A purified PCR product was ligated with pGEM®-T Easy vector and submitted for sequencing at AITbiotech Sequencing Lab, Singapore. Universal primers, SP6 and T7, were used in sequencing. The new allele of metallo-beta-lactamase sequence was translate to protein sequence by BioEdit program. A full sequence of new metallo-meta-lactamase allele was submitted to assign as a novel allele at NCBI database. DNA Sequences of novel allele were analyzed and compared with similar sequences which were IMP14, IMP-14a, IMP-32 and IMP-48.

6. Phylogenetic analysis

The nucleotide sequences of IMP type genes including IMP-65 were multiple alignment based on iterative refinement method. Evolution model of the *blaIMP* gene was selected for estimate the relationships among sequence themselves without regardless species of host. The evolutionary history using the Neighbor-Joining method and the evolutionary distances using the Kimura 2-parameter method phylogenetic tree analyzed were performed by MEGA program version 7.0.26.

7. Multi locus sequence typing for metallo beta-lactamase producing

MBL harboring *P. aeruginosa* were selected as representatives in each location when clinical isolates harbored the same MBL gene and demonstrated the same PFGE pattern (32). A total of 14 clinical isolates *P. aeruginosa* was chosen and characterized for sequence typing (ST) by MLST method. Seven of meropenem resistance among MDR *P. aeruginosa* clinical isolates were chosen for comparison.

P. aeruginosa clinical isolates were characterized for molecular typing. MLST was performed as described previously with some modifications (33). Briefly, seven housekeeping genes (*ascA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, and *trpE*), were amplified and sequenced. The nucleotide sequences were determined and compared with MLST database to assign the allele of these genes and STs (http://pubmlst.org/paeruginosa/). Primers for *mutL* and *nuoD* genes were modified in this study as showed in table 1.

Acknowledgement

Financial support from the Thailand Research Fund and Mahidol University to Piyatip Khuntayaporn is acknowledged (Grant No. TRG-5880129). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

References

1. **Bush K, Jacoby GA.** 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother **54:**969-976. 10.1128/AAC.01009-09

2. **Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S.** 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **35:**147-151.

3. **Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J.** 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis **48:**1-12. 10.1086/595011

4. **Santajit S, Indrawattana N.** 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int **2016:**2475067. 10.1155/2016/2475067

5. **Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC.** 2008. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. J Clin Microbiol **46:**2028-2037. 10.1128/JCM.00818-07

6. **Khosravi Y, Loke MF, Chua EG, Tay ST, Vadivelu J.** 2012. Phenotypic detection of metallo-beta-lactamase in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. ScientificWorldJournal **2012:**654939. 10.1100/2012/654939

7. **Nordmann P, Poirel L, Dortet L.** 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis **18:**1503-1507. 10.3201/eid1809.120355

8. **Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM, Carrilho E.** 2010. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. Anal Chem **82:**3-10. 10.1021/ac9013989

9. **EUCAST.** 2013. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Basel, Switzerland.

10. **CLSI.** 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty fifth Information Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI document M100-25.

11. **Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM.** 2011. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? Lancet Infect Dis **11:**381-393. 10.1016/S1473-3099(11)70056-1

12. **Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, Sahm DF, Bradford PA.** 2016. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo-beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **60:**1067-1078. 10.1128/AAC.02379-15

13. **Boonkerd N, Pibalpakdi P, Tiloklurs M, Niumsup PR.** 2009. Class 1 integron containing metallo beta-lactamase gene blaIMP-1 in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Thailand. J Infect Chemother **15:**257-261. 10.1007/s10156-009-0684-x

14. **Piyakul C, Tiyawisutsri R, Boonbumrung K.** 2012. Emergence of metallo-beta-lactamase IMP-14 and VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a tertiary-level hospital in Thailand. Epidemiol Infect **140:**539-541. 10.1017/S0950268811001294

15. **Rimrang B, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Sribenjalux P, Phumsrikaew W, Wonglakorn L, Kerdsin A, Chetchotisakd P.** 2012.

Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing Enterobacteriaceae in Thailand. J Antimicrob Chemother **67:**2626-2630. 10.1093/jac/dks267

16. **Prombhul S, Tribuddharat C, Laikijrung P, Aranya C, Bamrungsri N, Mekviwattanawong S.** 2016. New variant of an imipenemase, IMP-32, in *Klebsiella pneumoniae* from a fatal case of a Thai patient. J Med Microbiol **65:**572-573. 10.1099/jmm.0.000252

17. **Zhao WH, Hu ZQ.** 2015. Acquired metallo-beta-lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. Future Microbiol **10:**873-887. 10.2217/fmb.15.18

18. **Zhao WH, Hu ZQ.** 2011. IMP-type metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. Crit Rev Microbiol **37:**214-226. 10.3109/1040841X.2011.559944

19. **Mano Y, Saga T, Ishii Y, Yoshizumi A, Bonomo RA, Yamaguchi K, Tateda K.** 2015. Molecular analysis of the integrons of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan. BMC Microbiol **15:**41. 10.1186/s12866-015-0378-8

20. **Kim MJ, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Song JH, Choi JY, Yoon SS, Thamlikitkul V, Hsueh PR, Yasin RM, Lalitha MK, Lee K.** 2013. Dissemination of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of sequence type 235 in Asian countries. J Antimicrob Chemother **68:**2820-2824. 10.1093/jac/dkt269

21. **Samuelsen O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M, Lia A, Ranheim TE, Rajendra Y, Hermansen NO, Walsh TR, Giske CG.** 2010. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*

isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. Antimicrob Agents Chemother **54:**346-352. 10.1128/AAC.00824-09

22. **Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C, Juan C.** 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat **21-22:**41-59. 10.1016/j.drup.2015.08.002

23. **Kim CH, Kang HY, Kim BR, Jeon H, Lee YC, Lee SH, Lee JC.** 2016. Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals. J Microbiol **54:**44-49. 10.1007/s12275-016-5562-5

24. **Feng W, Sun F, Wang Q, Xiong W, Qiu X, Dai X, Xia P.** 2017. Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. J Glob Antimicrob Resist **8:**142-147. 10.1016/j.jgar.2016.11.012

25. **Koh TH, Khoo CT, Tan TT, Arshad MA, Ang LP, Lau LJ, Hsu LY, Ooi EE.** 2010. Multilocus sequence types of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore carrying metallo-beta-lactamase genes, including the novel bla(*IMP-26*) gene. J Clin Microbiol **48:**2563-2564. 10.1128/JCM.01905-09

26. **Wright LL, Turton JF, Hopkins KL, Livermore DM, Woodford N.** 2015. Genetic environment of metallo-beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the UK. J Antimicrob Chemother **70:**3250-3258. 10.1093/jac/dkv263

27. **Fan X, Wu Y, Xiao M, Xu ZP, Kudinha T, Bazaj A, Kong F, Xu YC.** 2016. Diverse Genetic Background of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Mainland China, and Emergence of an Extensively Drug-Resistant ST292 Clone in Kunming. Sci Rep **6:**26522. 10.1038/srep26522

28. **Lee JY, Song JH, Ko KS.** 2011. Identification of nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* isolates with reduced colistin susceptibility in Korea. Microb Drug Resist **17:**299-304. 10.1089/mdr.2010.0145

29. **Santella G, Pollini S, Docquier JD, Mereuta AI, Gutkind G, Rossolini GM, Radice M.** 2010. Intercontinental dissemination of IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* belonging in sequence type 621. J Clin Microbiol **48:**4342-4343. 10.1128/JCM.00614-10

30. **Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA.** 2006. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol **55:**1619-1629. 10.1099/jmm.0.46747-0

31. **Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y.** 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol **41:**5407-5413.

32. **Khuntayaporn P, Montakantikul P, Mootsikapun P, Thamlikitkul V, Chomnawang MT.** 2012. Prevalence and genotypic relatedness of carbapenem resistance among multidrug-resistant *P. aeruginosa* in tertiary hospitals across Thailand. Ann Clin Microbiol Antimicrob **11:**25. 10.1186/1476-0711-11-25

33. **Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG.** 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol **42:**5644-5649. 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004

Figure legends

Figure 1

Dissemination of MBL genes detected in *P. aeruginosa* across Thailand. Type of MBL genes were followed by number of samples.

Figure 2

Translated protein sequences of IMP14, IMP-14a, IMP-32, IMP-48 and IMP-65. The difference sequences was indicated in different color.

Figure 3

Evolutionary relationships of IMP-type genes. Phylogenetic tree of IMP type were analyzed by Neighbor-Joining method. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history. Novel IMP-65 was indicated by arrow.

381 Figure 1

382

383

384

385

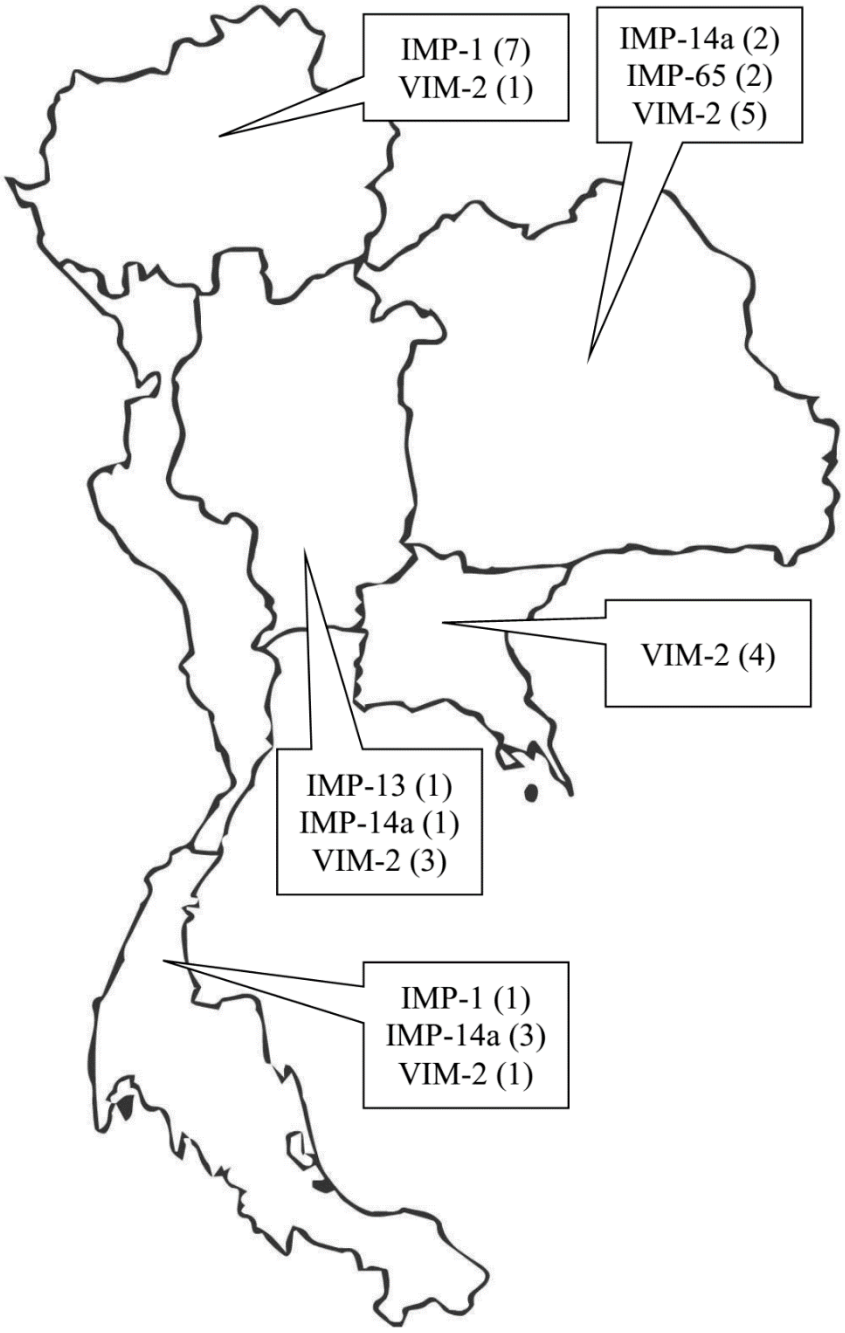


Figure 2

IMP-14 MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPFTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-14a MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPFTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-65 MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPFTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-32 MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPFTAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-48 MKKLFVLCVFFFCNIAVAEESLPDLKIEKLEEGVYVHTSFEEVKGWSVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPITAKDTEKLVNWFVERGYKIKGSISTHFHGDS
IMP-14 TAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-14a TAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-65 AAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-32 TAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFYGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-48 TAGIEWLNSQSIPTYASELTNELLKKDNKVQAKHSFNGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGYLGDANLEAWPKSAKI
IMP-14 LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
IMP-14a LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
IMP-65 LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
IMP-32 LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD
IMP-48 LMSKYGKAKLVVSSHSDIGDVSLLKRTWEQAVKGLNESKKSSQPSD

Figure 3

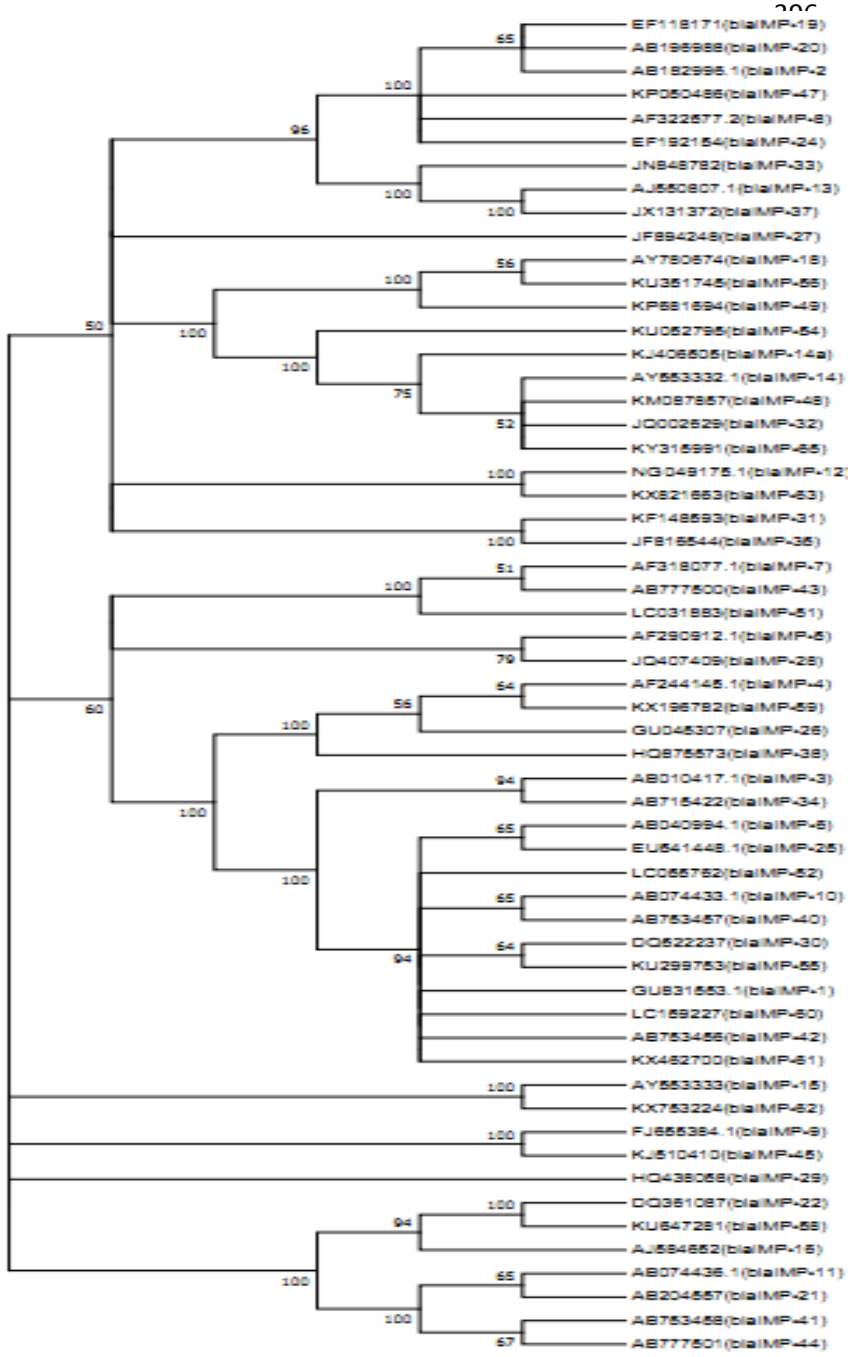

EF118171(blaIMP-19)
AB196988(blaIMP-20)
AB182996.1(blaIMP-2
KP050486(blaIMP-47)
AF322577.2(blaIMP-8)
EF192154(blaIMP-24)
JN848782(blaIMP-33)
AJ550807.1(blaIMP-13)
JX131372(blaIMP-37)
JF894248(blaIMP-27)
AY780574(blaIMP-18)
KU351745(blaIMP-55)
KP881694(blaIMP-49)
KU052795(blaIMP-54)
KJ406505(blaIMP-14a)
AY553332.1(blaIMP-14)
KM087857(blaIMP-48)
JQ002529(blaIMP-32)
KY315991(blaIMP-65)
NG049175.1(blaIMP-12
KX821663(blaIMP-63)
KF148593(blaIMP-31)
JF816544(blaIMP-35)
AF318077.1(blaIMP-7)
AB777500(blaIMP-43)
LC031883(blaIMP-51)
AF290912.1(blaIMP-6)
JQ407409(blaIMP-28)
AF244145.1(blaIMP-4)
KX196782(blaIMP-59)
GU045307(blaIMP-26)
HQ875573(blaIMP-38)
AB010417.1(blaIMP-3)
AB715422(blaIMP-34)
AB040994.1(blaIMP-5)
EU541448.1(blaIMP-25)
LC055762(blaIMP-52)
AB074433.1(blaIMP-10)
AB753457(blaIMP-40)
DQ522237(blaIMP-30)
KU299753(blaIMP-55)
GU931553.1(blaIMP-1)
LC159227(blaIMP-50)
AB753456(blaIMP-42)
KX452700(blaIMP-61)
AY553333(blaIMP-15)
KX753224(blaIMP-62)
FJ655364.1(blaIMP-9)
KJ510410(blaIMP-45)
HQ439058(blaIMP-29)
DQ351087(blaIMP-22)
KU647281(blaIMP-58)
AJ584652(blaIMP-16)
AB074436.1(blaIMP-11)
AB204557(blaIMP-21)
AB753458(blaIMP-41)
AB777501(blaIMP-44)

Table 1 List of primers designed in this study.

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Detectable gene	Group
IMP-AF	GTT AAC GGG TGG GGC GTT G	IMP-1, IMP-3, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-7, IMP-9, IMP-10, IMP-15, IMP-25, IMP-26	IMP-A
IMP-AR	AGC CAC TCT ATT CCG CCC GT		
IMP-BF	TTG AAG AAG TTA ACG GGT GGG G	IMP-1, IMP-11, IMP-16, IMP-21, IMP-22	IMP-B
IMP-BR	TTT CAA GAG CGA CGC ATC TCC		
IMP-CF	GGT TTG TGG AGC GCG GCT A	IMP-1, IMP-2, IMP-8, IMP-12, IMP-13, IMP-14, IMP-18, IMP-19, IMP-20, IMP-24	IMP-C
IMP-CR	CCT TTA ACA GCC TGT TCC CAT GT		
VIM-DF	TAG CGG TGA GTA TCC GAC AGT	VIM-2, VIM-3, VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10, VIM-11, VIM-14, VIM-15, VIM-16, VIM-17, VIM-18, VIM-20, VIM-23, VIM-24	VIM-D
VIM-DR	TGC TTC CGG GTA GTG TTG TTG		
VIM-EF	CCG GTC GGA GAG GTC CGA C	VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-5, VIM-12, VIM-19, VIM-25	VIM-E
VIM-ER	CCA GAT CGG CAT CGG CCA CG		
IMP-GF	GCT ACC GCA GCA GAG TCT TT	IMP-1, IMP-10, IMP-30, IMP-52	IMP-G
IMP-GR	CAG GCA ACC AAA CCA CTA CG		
IMP-HF	GGT TGG AGT GTG GTC ACT AAA C	IMP-14,IMP-14a, IMP-32, IMP-48, IMP-65	IMP-H
IMP-HR	CCA AAT AGC CAA GAC CGT CC		
IMP-13F	AAC ACG GTT TAG TGG TGC TTG T	IMP-13	
IMP-13R	TTA GTT ACT TGG TGA TGA TGT TT		
IMP-NF	ATG AAA AAA TTA TTT GTT TTA TGT	IMP-14, IMP-14a, IMP-32, IMP-48, IMP-65	
IMP-NR	TTA GTC GCT TGG CTG TGA		
mutL-F	AGG TTC GCG ACC TGT TCT T	*mutL*	
mutL-R	GGA CTC TCC AGC ACG CTC T		
nuoD-F	CAC CGA GTT CGA TCC CTA CT	*nuoD*	
nuoD-R	GGC ATC CAG TCG AGG AAC T		

Table 2 Multi-locus sequence typing (MLST) allelic profiles and sequence types (ST) of 21 *P. aeruginosa* clinical isolates collected across Thailand.

Strains	**ST**	**MBLs**	**acsA**	**aroE**	**guaA**	**mutL**	**nuoD**	**ppsA**	**trpE**
Metallo beta lactamases non-producing *P. aeruginosa*									
MPPA-051	235		38	11	3	13	1	2	4
MPPA-136	235		38	11	3	13	1	2	4
MPPA-241	235		38	11	3	13	1	2	4
MPPA-328	235		38	11	3	13	1	2	4
MPPA-342	235		38	11	3	13	1	2	4
MPPA-222	273		104	4	36	71	4	4	53
MPPA-002	1816		40	5	11	3	4	40	2
Metallo beta lactamases producing *P. aeruginosa*									
MPPA-092	235	VIM-2	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-198	235	VIM-2	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-213	235	VIM-2	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-217	235	VIM-2	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-286	235	IMP-14a	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-409	235	VIM-2	38	11	3	13	1	2	4
MPPA-066	964	IMP-1	145	5	26	3	4	4	26
MPPA-068	964	IMP-1	145	5	26	3	4	4	26
MPPA-103	964	IMP-1	145	5	26	3	4	4	26
MPPA-138	111	IMP-65	17	5	5	4	4	4	3
MPPA-155	111	IMP-65	17	5	5	4	4	4	3
MPPA-179	292	IMP-14a	109	10	73	3	4	4	3
MPPA-263	621	IMP-13	15	5	20	5	1	4	25
MPPA-135	1584	VIM-2	38	5	3	13	1	2	4