CHARACTERIZATION OF NEW CARBAPENEMASE, IMP-14, FROM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATED IN SIRIRAJ HOSPITAL

CHRIS VERATHAMJAMRAS

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7378-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ CARBAPENEMASE ชนิดใหม่, IMP-14, จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ที่แยกได้ในโรงพยาบาลศิริราช (CHARACTERIZATION OF NEW CARBAPENEMASE, IMP-14, FROM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATED IN SIRIRAJ HOSPITAL)

คริส วีรธรรมจำรัส 4636432 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, M.D., Ph.D., ประเสริฐ เอื้อวรากุล, M.D., Ph.D.

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีรายงานพบเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ดื้อยา carbapenem มากขึ้นเรื่อยๆ ในโรงพยาบาลศิริราช จากการศึกษาเดิมได้พบยีนสร้าง carbapenemase ชนิดใหม่คือยีน $bla_{IMP-14,}$ อยู่บน class 1 integron ในรูปของ gene cassette ในการศึกษาครั้งนี้ ส่วนของยีนดังกล่าวที่สมบูรณ์จะถูกนำมาทำการโคลนนิ่งและสร้างผลิตภัณฑ์ในเชื้อ *Escherichia coli* ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter เอนไซม์ IMP-14 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างในปริมาณมากได้โดยการใช้ IPTG เอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วย cation exchanger column ชนิด SP fast flow โดยปริมาณเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ประมาณ 1.85 มิลลิกรัมจากการเหนี่ยวนำเชื้อ 1 ลิตร การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ในการทำลายยา ampicillin, cefazolin, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, และ meropenem; และ การทดสอบการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย EDTA โดยใช้วิธี UV spectrophotometry พบว่า IMP-14 สามารถทำลาย cefazolin ได้ดีที่สุด ($6.59\ \mu M^{-1}.s^{-1}$) ในการทดลองครั้งนี้ และยาที่ทำลายได้ยากที่สุดในการทดลองครั้งนี้คือ ceftazidime ($0.06\ \mu M^{-1}.s^{-1}$) ส่วน aztreonam ไม่สามารถถูกทำลายได้ดังที่คาดไว้ตามคุณสมบัติของเอนไซม์ ประสิทธิภาพในการทำลายยา carbapenem พบว่า IMP-14 สามารถทำลาย imipenem ได้ดีกว่า meropenem ประมาณ 6.6 เท่า จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน พบว่าที่มีการแทนที่กรดอะมิโน 2 ตำแหน่งที่พบเฉพาะ IMP-14 คือ G65S และ N233Y ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการทำลายยา และควรศึกษาต่อในอนาคต นอกจากนี้ การที่ยีน bla_{IMP-14} ซึ่งเป็น integron gene cassette และอยู่ร่วมกับยีนดื้อยา aminoglycoside คือยีน *aac(6')* แสดงให้เห็นถึงปัญหาที่จะเกิดขึ้นได้ ไม่เพียงแต่ ข้อจำกัดในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการกำจัดเชื้อที่มียีนดื้อยาดังกล่าว ยังมีปัญหาการแพร่กระจายของยีนดื้อยาเหล่านั้นไปยังเชื้อชนิดอื่นๆซึ่งยากต่อการควบคุมอีกด้วย

131 หน้า. ISBN 974-04-7378-4

CHARACTERIZATION OF NEW CARBAPENEMASE, IMP-14, FROM *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATED IN SIRIRAJ HOSPITAL

CHRIS VERATHAMJAMRAS 4636432 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: CHANWIT TRIBUDDHARAT, M.D., Ph.D., PRESERT AUEWARAKUL, M.D., Ph.D.

ABSTRACT

Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates have been increasing steadily in Siriraj Hospital. Previous cloning experiments and DNA sequencing revealed a new variant of carbapenemase of the IMP-family, named bla_{IMP-14}, which is located on a class 1 integron element as a gene cassette. The complete open reading frame was subjected to cloning and expression in *Escherichia coli* under the control of a T7 promoter in order to obtain a high amount of the enzyme for enzyme kinetic analysis. The expression was induced by isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Although it was expected that a fusion form would be obtained, a possible native precursor form was obtained instead. The cation exchanger column, HiTrap™ SP FF, was used in the purification with sodium chloride gradient elution. About 1.8 mg of highly purified IMP-14 was obtained from 1 liter of the induced BL21 pLysE *E. coli*. Ampicillin, cefazolin, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, and meropenem were used as substrates in enzyme kinetic analysis using UV spectrophotometry. The EDTA was also used in inhibition test of this metallo-beta-lactamase. Cefazolin showed the highest k_{cat}/K_m value, 6.590 $\mu M^{-1}.s^{-1}$, whereas ceftazidime showed the lowest k_{cat}/K_m, 0.06 $\mu M^{-1}.s^{-1}$. Aztreonam, the monobactam, could not be hydrolyzed by IMP-14 as expected for enzymes in the class of metallo-β-lactamases. The hydrolytic activity of IMP-14 for imipenem was 6.6 times better than for meropenem. The amino acid sequence comparison showed two unique amino acid substitutions, G65S and N233Y, which might be involved in enzymatic reaction and need to be studied further. The existence of the bla_{IMP-14} as an integron gene cassette accompanied by an aminoglycoside resistance gene, *aac(6')*, presents impending problems in therapeutic management, not only limiting treatment options in particular isolates due to the presence of multiple antibiotic resistance genes, but also disseminating of these resistant determinants to other bacteria. This could be very difficult to control.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa* / *bla*IMP-14 / IMP-14 /
/ METALLO-BETA-LACTAMASE / CARBAPENEMASE /

131 P. ISBN 974-04-7378-4