



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาระบบมัลติดรัก อีพลักซ์เชื้อซูโดโมนาส แอร์รูจินโนซ่าที่แยกได้จาก
ผู้ป่วยและสัตว์: บทบาทต่อการดื้อยาปฏิชีวนะและการพัฒนาวิธีการตรวจ
การดื้อยาที่เนื่องมาจากการแสดงออกของระบบ

โดย

รศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

มิถุนายน 2556

สัญญาเลขที่ RMU5380035

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาระบบมัลติดริค อีฟลักซ์เชื้อจุลินทรีย์แอโรบิกที่แยกได้จาก
ผู้ป่วยและสัตว์: บทบาทต่อการดื้อยาปฏิชีวนะและการพัฒนาวิธีการตรวจ
การดื้อยาที่เนื่องมาจากการแสดงออกของระบบ

รศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติเงินทุนเพิ่มขีดความสามารถของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษาตามโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปีงบประมาณ 2553 โดยได้รับการสนับสนุนเพิ่มเติมจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย เจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและจัดทำรายงานการวิจัย

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2556

Abstract

Project Code : RMU5380035

Project Title : Study of Multidrug Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients and Animals: Role in Antibiotic Resistance and Development of Detection Method for the Differential Diagnosis of Efflux-Mediated Resistance

Investigator : 1. Assoc. Prof. Dr. Rungtip Chuanchuen
Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University
2. Assist. Prof. Dr. Chanwit Tribuddharat
Faculty of Medicine, Mahidol University

E-mail Address : rchuanchuen@yahoo.com

Project Period : 15 June 2010 -14 June 2013

Keywords : Antimicrobial resistance, Multidrug efflux systems, *Pseudomonas aeruginosa*

Role of Multidrug Efflux Systems (MEX) and other resistance mechanisms in multiple-antibiotic resistance phenotype was examined in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from sick animals and patients. For panaminoglycoside (AMG) resistance in the animal and human isolates, MexXY exhibited variable impacts and the results indicate the existence of uncharacterized AMG-resistance mechanisms. A variety of aminoglycoside-modifying enzyme encoding genes were found at high rate in the animal ($n=14$) and human ($n=100$) isolates. Contribution of MexAB-OprM on β -lactam was diverse. One of the major findings was simultaneous expression of four Mex systems in a *P. aeruginosa* clinical isolate and co-expression of normally-silent MEX systems was also observed. The results suggest that MEX Systems play an important role in antibiotic resistance in *P. aeruginosa* clinical isolates and their expression is dynamically different. Therefore, Efflux Pump Inhibitor that affects all MEX in the RND family is an ideal. Multiplex RT-PCR for expression detection of four clinically-important MEX systems including MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN and MexXY was also developed.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU5380035

ชื่อโครงการ : การศึกษาระบบมัลติดริค อีฟลักซ์ในเชื้อซูโดโมนาส แอร์จิโนซาที่แยกได้จากผู้ป่วยและสัตว์: บทบาทต่อการดื้อยาปฏิชีวนะและการพัฒนาวิธีการตรวจการดื้อยาที่เนื่องมาจากการแสดงออกของระบบ

ชื่อนักวิจัย : 1. รศ.สพ.ญ.ดร. รุ่งทิพย์ ชวนชื่น
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ผศ.ดร. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : rchuanchuen@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2553 – 14 มิถุนายน 2556

ศึกษาบทบาทของระบบ Multidrug Efflux Systems (MEX) และกลไกอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันใน *Pseudomonas aeruginosa* ที่เป็นเชื้อทางคลินิกแยกได้จากผู้ป่วยและผู้ป่วย สำหรับการดื้อยาอะมิโนกลัยโคไซด์ (AMG) หลายชนิดพร้อมกันทั้งในเชื้อที่แยกได้จากสัตว์และคนพบว่าส่วนร่วมของระบบ MexXY มีความหลากหลายและยังมีกลไกอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา AMGs ที่ไม่ได้ทำการศึกษา ซึ่งพบการปรากฏของยีน aminoglycoside-modifying enzymes ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัข แมว ($n=14$) และผู้ป่วย ($n=100$) จำนวนหลายชนิดและในอัตราที่สูง บทบาทของระบบ MexAB-OprM ต่อการดื้อยา β -lactams มีความหลากหลายเช่นกัน ผลการวิจัยหนึ่งที่สำคัญคือ การแสดงออกของระบบ MEX พร้อมกันถึง 4 ระบบใน *P. aeruginosa* ที่เป็นเชื้อทางคลินิก 1 เชื้อ และพบการแสดงออกพร้อมกันของระบบ MEX ที่โดยปกติไม่มีการแสดงออกด้วย ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าระบบ MEX มีบทบาทสำคัญในการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันใน *P. aeruginosa* ที่เป็นเชื้อทางคลินิกและการแสดงออกของระบบมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรพัฒนา Efflux Pump Inhibitor ที่มีผลต่อการทำงานของระบบ MEX ในวงศ์ตระกูล RND ทุกระบบ รวมทั้งมีการพัฒนา Multiplex RT-PCR สำหรับตรวจการแสดงออกของระบบ Mex 4 ระบบที่มีความสำคัญทางคลินิกได้แก่ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY ด้วย

Executive Summary

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ โดยเป็นสาเหตุที่สำคัญของการติดเชื้อแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาทันทีในโรงพยาบาล (nosocomial infection) และมักพบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแทรกซ้อนในสัตว์และคนที่มีอาการป่วยเรื้อรัง การติดเชื้อชนิดนี้มักไม่สามารถรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ เพราะ *P. aeruginosa* ดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน ส่งผลให้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะล้มเหลวในที่สุด ซึ่งระบบ Multidrug Efflux Pump (MEX) มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันในเชื้อชนิดนี้ ในปัจจุบันพบว่า ระบบ MexXY เป็นระบบเดียวที่ขับออกยาในกลุ่ม aminoglycosides ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญของการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในการวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาใน *P. aeruginosa* ที่เป็นเชื้อทางคลินิกและแยกได้จากสัตว์ป่วยหรือผู้ป่วย พบว่าบทบาทของระบบ MexXY ต่อการดื้อยา ในกลุ่ม aminoglycosides มีความหลากหลายและยังมีกลไกอื่นๆที่รับผิดชอบต่อการดื้อ aminoglycosides ในเชื้อเหล่านี้ โดยพบการปรากฏของยีนควบคุม aminoglycoside-modifying enzyme หลายชนิดในเชื้อที่แยกได้จากสุนัข แมว ($n=14$) และผู้ป่วย ($n=100$) และในอัตราที่สูง ระบบ MexAB-OprM ที่โดยปกติแสดงออกอย่างตลอดเวลามีส่วนร่วมในการดื้อยา β -lactams ในระดับที่แตกต่างกันในแต่ละเชื้อ พบการแสดงออกของระบบ MEX มากกว่า 1 ระบบพร้อมกันในเชื้อเพียงตัวเดียว โดยพบการแสดงออกพร้อมกันของระบบที่มีความสำคัญทางคลินิกมากถึง 4 ระบบ ได้แก่ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบ MexCD-OprJ และ MexEF-OprN ที่ปกติจะไม่แสดงออก ผลการวิจัยแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของระบบ MEX ต่อการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันใน *P. aeruginosa* ที่เป็นเชื้อทางคลินิกและการแสดงออกของระบบ MEX เหล่านี้มีความหลากหลาย ดังนั้น Efflux Pump Inhibitor ควรจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของระบบ MEX หลายระบบหรือทุกระบบพร้อมกันเพื่อให้มียาปฏิชีวนะที่เป็นทางเลือกในการรักษามากขึ้น นอกจากนี้ เทคนิคในการตรวจการแสดงออกของระบบควรสามารถทำได้หลายระบบพร้อมกัน ซึ่ง multiplex RT-PCR เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและค่าใช้จ่ายไม่สูงเกินไป

สารบัญ

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
Executive summary	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	4
วิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	19
การอภิปรายผลการวิจัย	43
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	53
เอกสารอ้างอิง	54
Outputs ที่ได้จากโครงการ	58
ภาคผนวก	59

รายการตารางประกอบ

	หน้าที่
ตารางที่ 1	6
ตารางที่ 2	8
ตารางที่ 3	11
ตารางที่ 4	20
ตารางที่ 5	28
ตารางที่ 6	26
ตารางที่ 7	30
ตารางที่ 8	31
ตารางที่ 9	33
ตารางที่ 10	37
ตารางที่ 11	38
ตารางที่ 12	39
ตารางที่ 13	39
ตารางที่ 14	42

รายการภาพประกอบ

	หน้าที่
รูปที่ 1 การตัด <i>mexXY</i> บนโครโมโซมด้วยเทคนิค gene replacement	14
รูปที่ 2 การตัด <i>mexXY</i> operon	15
รูปที่ 3 การแสดงออกของ <i>mexXY</i> ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัขและแมว	22
รูปที่ 4 PCR product ที่ได้จากการตรวจการปรากฏของยีนควบคุม aminoglycoside-modifying enzymes (บางชนิด)	25
รูปที่ 5 กราฟแสดงอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides ของ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ที่ได้จากผู้ป่วย (n=100)	26
รูปที่ 6 การตรวจการแสดงออกของยีน <i>nuoH</i> และ <i>mexY</i> ด้วยวิธี RT-PCR	27
รูปที่ 7 อัตราการพบยีน aminoglycoside-modifying enzymes ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย (n=30)	29
รูปที่ 8 การตรวจการแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ และ MexEF-OprN ด้วยเทคนิค RT-PCR	32
รูปที่ 9 Rep-PCR patterns ของเชื้อ <i>P. aeruginosa</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วย (n=13)	35
รูปที่ 10 PCR patterns ที่ได้จากการตรวจการแสดงออกของระบบ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ <i>mexXY</i> ด้วย Multiplex RT-PCR	41

บทนำ

Pseudomonas aeruginosa เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ ในผู้ป่วยพบการติดเชื้อชนิดนี้ได้บ่อยและเป็นสาเหตุสำคัญอันดับ 2 ของการติดเชื้อแทรกซ้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล มักพบเป็นเชื้อโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องได้แก่ ผู้ป่วยโรคเอดส์ โรคมะเร็งในเม็ดเลือดขาว ผู้ป่วยที่ได้รับยาสเตียรอยด์เป็นเวลานาน ผู้ที่มีแผลไฟไหม้ ผู้ป่วยที่มีแผลผ่าตัด เป็นต้น ในสัตว์ มักพบการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในหูสุนัขที่มีอาการอักเสบของหูชั้นนอกแบบเรื้อรัง (Otitis Externa) และไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ [1] รวมทั้ง ในสุนัขที่มีความผิดปกติของไตแบบเรื้อรัง ในวัวนม *Pseudomonas mastitis* เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบที่ไม่แสดงอาการ มักเป็นการติดเชื้อซ้ำและมีสาเหตุมาจากเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม [2, 3] ในขณะเดียวกัน อาจเป็นโรคเต้านมอักเสบแบบที่มีเนื้อตาย เรียกว่า gangrene mastitis ซึ่งพบไม่บ่อยนัก แต่ถ้าพบมักมีอาการรุนแรงมากและทำให้สัตว์เสียชีวิตหรือถูกคัตทิ้ง [4] ถึงแม้ว่าการติดเชื้อจากสัตว์สู่คนยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่ไม่อาจมองข้าม [5] สันนิษฐานว่าการขับถ่ายเชื้อที่ดื้อยาของสัตว์จะเพิ่มการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและเพิ่มโอกาสของการติดเชื้อในคน

การติดเชื้อ *P. aeruginosa* มักเป็นแบบเรื้อรังและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ เชื้อชนิดนี้ดื้อต่อยาหลายชนิดพร้อมกันโดยธรรมชาติอยู่แล้วและสามารถพัฒนาการดื้อยาขึ้นได้อีกในระหว่างการรักษา ดังนั้นจึงตอบสนองต่อยาแต่ละชนิดเพียงชั่วระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ส่งผลให้ต้องใช้ยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า เพิ่มระยะเวลาในการรักษาและสูญเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้น การรักษาอาจล้มเหลวและส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ในที่สุด กลุ่มยาที่สำคัญและเป็นทางเลือกในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในปัจจุบัน คือ β -lactams และ aminoglycosides อย่างไรก็ตามพบว่า อัตราการดื้อต่อยาทั้ง 2 ชนิดใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีแนวโน้มสูงขึ้น ที่ผ่านมามีพบว่า เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง intensive care units (ICUs) มักดื้อต่อยา ceftazidime, imipenem และ gentamicin [6] เชื้อที่แยกได้จากหูและแผลฝีของสุนัขดื้อยาในกลุ่ม β -lactams เช่น ampicillin cefoxin cefpodoxime cephalothin amoxicillin/clavulanic acid และ ยาในกลุ่ม aminoglycosides เช่น kanamycin streptomycin gentamycin amikacin และ spectinomycin เป็นต้น [7, 8]

เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า สาเหตุสำคัญของการดื้อยาในระดับสูงและหลายชนิดพร้อมกันของ *P. aeruginosa* เกิดจากการที่ผนังเซลล์ไม่ยอมให้โมเลกุลของยาปฏิชีวนะจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ร่วมกับการแสดงออกของระบบ Multidrug Efflux Pumps, MEX (รูปที่ 1) ที่ขับโมเลกุลของยาออกนอกเซลล์จนทำให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ไม่เพียงพอที่จะทำลายเชื้อได้ [9, 10] ระบบ MEX ใน *P. aeruginosa* สร้างปัญหาการดื้อยาเป็นอันดับ 2 รองจากเอนไซม์ดื้อยาที่ผลิตโดยแบคทีเรียเอง โดยทั่วไป กลไกดื้อยาในแบคทีเรียทำให้เกิดการดื้อยาจำเพาะ 1 ชนิดหรือ 1 กลุ่ม แต่ระบบ MEX ทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดในเวลาเดียวกัน *P. aeruginosa* มีชุดยีนควบคุมการแสดงออกของระบบ MEX มากถึง 12 ชุดบนโครโมโซม โดยระบบที่พบว่ามีสำคัญต่อการดื้อยาใน clinical isolates คือ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY แต่ละระบบขับออกยาได้มากกว่า 1 ชนิดและยาแต่ละชนิดอาจถูกขับออกได้ด้วยหลายระบบ (ตารางที่ 1) ผลเสียหายนะรุนแรงมากขึ้น ถ้ามีการแสดงออกของระบบ MEX มากกว่า

1 ระบบพร้อมกันหรือร่วมกับกลไกตัวย่ออื่นๆ [11] ซึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน MEX คือ การใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็นอย่างต่อเนื่องและขาดความระมัดระวัง [12] ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนควบคุมส่งผลให้มีการแสดงออกของระบบ

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาระบบ MEX ใน *P. aeruginosa* อย่างกว้างขวาง โดยเน้นการศึกษา กลไกการทำงานและหาแนวทางในการยับยั้งการทำงานของระบบเพื่อให้สามารถใช้ยาปฏิชีวนะที่มีอยู่ใน การรักษาได้อีก รวมทั้งการพัฒนาเทคนิคในการตรวจการดื้อยาที่เกิดจากการแสดงออกของระบบเพื่อให้ สามารถวินิจฉัยและเลือกยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม โดยเทคนิคนี้จะต้องให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ และต้นทุน ไม่สูง สามารถนำผลการตรวจใช้ประกอบการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* โดยเฉพาะในรายที่มีการติดเชื้ออย่างเรื้อรังและมีปัญหาการดื้อยาหลายชนิด ทั้งนี้การยืนยันได้ว่าการแสดงออกของระบบ MEX เป็นสาเหตุของการดื้อยาในผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยแต่ละราย รวมทั้งสามารถ ที่จะบอกได้ว่าเป็นระบบใดจะส่งผลให้สามารถแนะนำให้ใช้ยาที่ไม่เป็น substrates ของระบบนั้น ที่สำคัญก็คือ การใช้ efflux pump inhibitors (EPI) ร่วมในการรักษา ซึ่งขณะนี้ได้มีการพัฒนาการผลิต EPI เพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ *P. aeruginosa* ในประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น อาจมีการนำมา ใช้ในวงการแพทย์และสัตวแพทย์ในอนาคตอันใกล้ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคการตรวจดังกล่าวเป็นการ เตรียมความพร้อมเพื่อพัฒนาการรักษาโรคติดเชื้อในของวงการแพทย์และสัตวแพทย์ในประเทศไทย

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาระบบ MEX อย่างกว้างขวางในต่างประเทศ การศึกษาเหล่านี้ยังจำกัดอยู่ใน เชื้อที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมีไม่มากนักและยังไม่มี รายงานการศึกษาระบบนี้ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย รวมทั้งมีการศึกษาในเชื้อที่แยกได้จาก สัตว์น้อยมาก เท่าที่ทราบมีเพียง 2 เท่านั้นและเรื่องหนึ่งเป็นผลงานวิจัยของหัวหน้าโครงการ (Chuanchien et al, 2008. Microbiology Immunology 58:392-398)

สำหรับประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างกว้างขวางทั้งในวงการแพทย์และสัตวแพทย์ ในขณะที่ *P. aeruginosa* เป็นสาเหตุอันดับต้นๆ ของการติดเชื้อแทรกซ้อนและมักดื้อยาหลายชนิดพร้อม กัน ซึ่งรวมถึง β -lactams และ aminoglycosides ที่มีบทบาทสำคัญในการเป็น “drugs of choice” สำหรับการรักษาการติดเชื้อชนิดนี้ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษายาของระบบ Mex ต่อการดื้อยา β -lactams และ aminoglycosides ของ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยใน โรงพยาบาลและสัตว์ป่วย ตรวจการแพร่กระจายของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่ควบคุมดื้อต่อยาทั้ง 2 กลุ่ม รวมทั้งพัฒนาวิธีที่ใช้ตรวจการดื้อยาที่เนื่องมาจากแสดงออกของระบบ MEX ที่มีความสำคัญทาง คลินิก คือ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY

ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทและความสำคัญของระบบ MEX ต่อการดื้อยาในเชื้อ *P. aeruginosa* ในผู้ป่วยและสัตว์ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย ข้อมูล เชื้อแบคทีเรียและ plasmid ที่ได้สามารถใช้เป็นพื้นฐานสำคัญของการวิจัย ต่อไป เช่น การศึกษาอิทธิพลของการใช้ยามาเชื้อในฟาร์ม คลินิกและโรงพยาบาลต่อการพัฒนาการดื้อยาปฏิชีวนะที่มีสาเหตุเชื่อมโยงมา จากระบบ รวมถึงการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการทำงานของระบบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ของยาที่ใช้ในการรักษา ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการแพทย์และสัตวแพทย์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

คณะผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า ระบบ Multidrug efflux pumps ในวงศ์ตระกูล Resistance Nodulation Cell Division มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาในเชื้อ *P. aeruginosa* clinical isolates ทั้งในผู้ป่วยและสัตว์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงตั้งวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อศึกษาบทบาทของระบบ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY ต่อการดื้อยาในกลุ่ม β -lactams และ aminoglycosides
2. เพื่อพัฒนาเทคนิคในการตรวจการดื้อยาที่เกิดจากการแสดงออกของระบบ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY

วิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษา

1. *P. aeruginosa*, *E. coli* และ plasmid ที่ใช้เป็นตัวควบคุมหรือใช้ในการตัดต่อทางพันธุกรรม แสดงในตารางที่ 1
2. *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสัตว์ มีจำนวน 14 isolates (ตารางที่ 1) เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากสุนัขและแมวป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ โดยส่งตัวอย่างไปทำการแยกเชื้อที่หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ เชื้อทั้งหมดใช้ในการศึกษาการแพร่กระจายของ aminoglycoside-resistance encoding genes และ ระบบ multidrug efflux
3. *P. aeruginosa* ที่แยกได้ผู้ป่วย มีจำนวนทั้งหมด 100 isolates (ไม่ได้แสดงในตารางทั้งหมด) เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาภายในโรงพยาบาลศิริราช ในช่วงปี พ.ศ. 2544-2545 ทำการแยกและพิสูจน์เชื้อโดยภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล โดยเชื้อทั้งหมดใช้ในการศึกษาการแพร่กระจายของ aminoglycoside-resistance encoding genes และ เชื้อจำนวน 30 isolates ใช้ในการศึกษาระบบ multidrug efflux (ตารางที่ 1)

อาหารเลี้ยงเชื้อและยาปฏิชีวนะ

อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปคือ Luria-bertani (LB) หรือ Muller Hinton medium (Difco, Detroit, MI) ยกเว้น ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหรือสภาวะที่แตกต่างออกไปจะระบุไว้โดยเฉพาะ ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้สำหรับ *P. aeruginosa* คือ carbenicillin (Gemini Bioproducts, CA USA.) 150-500 µg/ml gentamycin 5-50 µg/ml และ spectinomycin (Sigma) 300 µg/ml ส่วนความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ใน *E. coli* คือ ampicillin (Sigma, St. Louis, MO) 100 µg/ml, gentamycin 15 µg/ml, spectinomycin (Sigma) 150 µg/ml และ kanamycin (Sigma) 35 µg/ml

ตารางที่ 1 แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์	ข้อมูลหรือลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้อง	แหล่งที่มา
<i>Pseudomonas</i>		
PAO1MV	Wild type expressing MexAB-OprM, laboratory strain	[13]
PA3579	PAO1 with $\Delta mexZ$	[14]
PAO267	PA3579 with $\Delta(mexAB-oprM)$	[15]
PAO280	PA267 with $\Delta(mexXY)$	[15]
Animal isolates		
PAJ226	แยกจากหนองในแมว	การศึกษารังนี้
PAJ227	แยกจากปัสสาวะของแมว	การศึกษารังนี้
PAJ228	แยกจากโพรงจมูกของแมว	การศึกษารังนี้
PAJ229	แยกจากปัสสาวะในแมว	การศึกษารังนี้
PAJ230	แยกจากโพรงจมูกในแมว	การศึกษารังนี้
PAJ232	แยกจากหูสุนัข	การศึกษารังนี้
PAJ233	แยกจากหนองในสุนัข	การศึกษารังนี้
PAJ234	แยกจากหูสุนัข	การศึกษารังนี้
PAJ235	แยกจากปัสสาวะของสุนัข	การศึกษารังนี้
PAJ237	แยกจากปัสสาวะของแมว	การศึกษารังนี้
PAJ238	แยกจากโพรงจมูกของแมว	การศึกษารังนี้
PAJ239	แยกจากหนองและแผลในสุนัข	การศึกษารังนี้
PAJ240	แยกจากหูสุนัข	การศึกษารังนี้
PAJ245	แยกจากบาดแผลในแมว	การศึกษารังนี้
Human isolates		
PAJ107	แยกจาก sputum	การศึกษารังนี้
PAJ111	แยกจากหนอง	การศึกษารังนี้
PAJ114	แยกจากปัสสาวะ	การศึกษารังนี้
PAJ120	แยกจากเลือด	การศึกษารังนี้
PAJ123	แยกจาก sputum	การศึกษารังนี้
PAJ127	แยกจากเนื้อเยื่อ	การศึกษารังนี้
PAJ128	แยกจากปัสสาวะ	การศึกษารังนี้
PAJ133	แยกจาก sputum	การศึกษารังนี้
PAJ145	แยกจาก bronchial wash	การศึกษารังนี้
PAJ146	แยกจากปัสสาวะ	การศึกษารังนี้
PAJ147	แยกจาก sputum	การศึกษารังนี้
PAJ148	แยกจากอวัยวะเพศ (penis)	การศึกษารังนี้

Abbreviations: Ap^r, ampicillin resistance; Cb^r, carbenicillin resistance; Gm^r, gentamycin resistance, Sp^r, spectinomycin resistance, ^aP_{tac}, *E. coli trp* operon promoter.

ตารางที่ 1 แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

สายพันธุ์	ข้อมูลหรือลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้อง	แหล่งที่มา
PAJ151	แยกจาก sputum	การศึกษารั้งนี้
PAJ163	แยกจากหนอง	การศึกษารั้งนี้
PAJ166	แยกจากปัสสาวะ	การศึกษารั้งนี้
PAJ172	แยกจากปัสสาวะ	การศึกษารั้งนี้
PAJ173	แยกจากน้ำในเยื่อหุ้มปอด	การศึกษารั้งนี้
PAJ175	แยกจากหนอง	การศึกษารั้งนี้
PAJ176	แยกจาก bronchial wash	การศึกษารั้งนี้
PAJ189	แยกจาก sputum	การศึกษารั้งนี้
PAJ191	แยกจาก sputum	การศึกษารั้งนี้
PAJ197	แยกจากหนอง	การศึกษารั้งนี้
PAJ203	แยกจากปัสสาวะ	การศึกษารั้งนี้
PAJ204	แยกจากหนอง	การศึกษารั้งนี้
PAJ207	แยกจากหนอง	การศึกษารั้งนี้
PAJ208	แยกจาก sputum	การศึกษารั้งนี้
PAJ212	แยกจากน้ำไขสันหลัง	การศึกษารั้งนี้
PAJ213	แยกจาก sputum	การศึกษารั้งนี้
PAJ214	แยกจากปัสสาวะ	การศึกษารั้งนี้
PAJ215	แยกจากหนอง	การศึกษารั้งนี้
<i>E. coli</i>		
HPS ₁	A cloning host (F ⁻ Δ (lac-proAB) ndA1gyrA96hsdR17supE44relA 1recA1thirif ^R ZZX::mini-Tn ₅ (lac _a))	
DH5 α	A cloning host (F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1)	
Plasmid		
PCR2:1	Ap ^r ; a cloning vector for PCR products	Invitrogen
pUCP20	Ap ^r ; a cloning vector	[16]
pPS1221	Ap ^r , Gm ^r : pEX18Ap containing Δ (mexXY) ::FRT-Gm ^r fragment	[17]
pAMR1	Ap ^r , pUC20 carrying mexXY	[14]

Abbreviations: Ap^r, ampicillin resistance; Cb^r, carbenicillin resistance; Gm^r, gentamycin resistance, Sp^r, spectinomycin resistance, ^aP_{tac}, *E. coli trp* operon promoter.

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเชื้อเจริญเติบโตของเชื้อจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ด้วยวิธี Agar dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Muller Hinton Agar (MHA) หรือวิธี the standard two-fold microdilution technique ตามมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) [18] โดยใช้การเจือจางแบบ two-fold ยาปฏิชีวนะที่ทดสอบจำนวน 16 ชนิด คือ carbenicillin, piperacillin, ceftaxidime, aztreonam, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, spectinomycin, ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, tobramycin และ trimethoprim เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุมได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29212 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัยแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการวิจัย

ยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้นที่ทดสอบ (µg/ml)	Breakpoint (µg/ml)	
		Human	Animal
1. carbenicillin (CAR)	8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048	512	512*
2. piperacillin (PIP)	4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512	128	128*
3. ceftaxidime (CEF)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32	32*
4. aztreonam (ATM)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32	32*
5. amikacin (AMK)	4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512	64	64
6. gentamicin (GEN)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16	8
7. kanamycin (KAN)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16	64
8. neomycin (NEO)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16	10
9. streptomycin (STR)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32	64
10. spectinomycin (SPC)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	32	128
11. ciprofloxacin (CIP)	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	4	4*
12. tetracycline (TET)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16	16*
13. erythromycin (ERY)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	8	8*
14. chloramphenicol (CHP)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512	32	32*
15. trimethoprim (TRI)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	4	4*
16. tobramycin (TOB)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256	16**	8

*ใช้ breakpoints ของเชื้อที่แยกได้จากมนุษย์

**[19]

เมื่อทดสอบส่วนร่วมของระบบ MexAB-OprM ต่อ β -lactams เลือกใช้ยา carbenicillin เป็น indicator โดยหาค่า MIC ด้วยวิธี Broth microdilution ในสถานะที่มีและไม่มี Efflux Pump Inhibitor (EPI) ซึ่ง EPI ที่ใช้คือ Phenylalanine Arginine β -naphthylamide (PA β N) (Sigma-Aldrich, MO, USA) ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ความเข้มข้นของ PA β N ความเข้มข้น 50 μ g/ml

เทคนิคทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับ DNA, Primers และการถอดรหัสพันธุกรรม

เตรียม Chromosomal DNA โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป ISOQUICK Nucleic acid extraction kit (ORCA, WA) และ QiAmp kit (Qiagen, Valencia, CA) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต เตรียมพลาสมิดได้ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAprep[®] Mini-spin kit (Qiagen) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต ส่วนการสกัด DNA จาก gel และการทำให้บริสุทธิ์ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Gel purification kit (Qiagen) สำหรับการตรวจหาการปรากฏของ aminoglycoside-modifying enzymes ใช้ whole cell DNA เตรียมโดย boiling preparation โดยละลายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อในน้ำกลั่น 50 μ l และต้มในน้ำเดือด 10 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 13,000xg เพื่อแยกตะกอน เก็บส่วนของเหลวใสที่ -20°C

เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

Primers ที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้แสดงในตารางที่ 3 การทำ PCR ปฏิกริยามีปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 5 μ l of total DNA, 10 pmoles of each primer และ 12.5 μ l 2.5 X PCR master mix eppendorf[®] MasterMix (Eppendorf, Hamburg, Germany) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต หรือ KAPATaq ReadyMix DNA polymerase (KapaBiosystems, Boston, MA, USA)

การถอดรหัสพันธุกรรม

เตรียม DNA โดยสกัด PCR products ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด QIAQuick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) และส่งไปตรวจหาลำดับเบสที่ Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) โดยใช้ primers ที่ใช้ในการทำ PCR เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่เผยแพร่ใน Pseudomonas genome project (www.pseudomonas.com)

การทำ Reverse Transcription PCR (RT PCR)

สกัด Total RNA จาก *P. aeruginosa* PAO1 และ clinical isolates จาก clinical isolates ทั้งหมด โดยใช้ the Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen) ทำการกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย RNase-free DNaseI (Invitrogen, CA, USA) จากนั้นทำการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยชุดทดสอบ the SuperScript III Platinum Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR[®] Green (Invitrogen) และ/หรือ ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) โดยใช้ primer down ของ ยีนที่เกี่ยวข้อง นำ cDNA 1 μ g มาทำ conventional PCR ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น

การทำ Quantitative realtime-RT PCR (qRT-PCR)

ศึกษาการระดับการแสดงออก (transcription level) ของยีน *mexY* และ PA5471 โดยเตรียม cDNA จาก total RNA 1 µg ด้วย KAPA SYBR[®] FAST qPCR kit (Kapabiosystems ตามคำแนะนำของผู้ผลิตโดย Specific primers เจือจาง cDNA เจือจางให้ได้ threshold cycle (Ct) อยู่ภายในกราฟมาตรฐาน ทำ PCRs 3 ซ้ำใน a Rotor-Gene[™] 3000 Real Time Thermal Cyclor (Corbett Research, Sydney, Australia) สำหรับแต่ละตัวอย่าง คำนวณ the mean cDNA copy numbers จาก Ct values ที่ได้

ตารางที่ 3 Primers ที่ใช้ในการวิจัย

Primers	ลำดับเบส	แหล่งที่มา
RT-PCR		
mexYRTup	5'-AGCTACAACATCCCTA-3'	[15]
mexYRTdown	5'-AGCACGTTGATCGAGAAG-3'	
nuoHF657-U	5'-GCAGGAACTGGCGGACGG-3'	
nuoHL823-L	5'-GGTCTTGGCGGCGAAGTAGAA-3'	
qRT-PCR		
mexYRTup	5'-AGCTACAACATCCCTA-3'	[15]
mexYRTdown	5'-AGCACGTTGATCGAGAAG-3'	
PA5471-U	5'-CGACATCGGCTGTGGCA-3'	
PA5471-L	5'-AGTCGCTCCAGGTCTCGTC-3'	
rpsl-realtimup	5'-CGGCACTGCGTAAGGTATG-3'	[15]
rpslrealtim down	5'-CCCGGAAGGTCCTTTACACG-3'	
mexBRTup	5'-ATCTACCGGCAGTTCTCC-3'	This study
mexBRTdown	5'-CGATCACCACGTAGATCAG-3'	
mexDRTup	5'-CTACCCTGGTGAAACAGC-3'	This study
mexDRTdown	5'-AGCAGGTACATCACCATCA-3'	
mexFRTup	5'-CATCGAGATCTCCAACCT-3'	This study
mexFRTdown	5'-GTTCTCCACCACCACGAT-3'	
mexKup	5'-ATGCTACGGCCTTCTACC-3'	This study
mexKdown	5'-CCACGTAGTTGTCGATGC -3'	
mexWup	5'-GCCCTGTTCAAGGAGTTC-3'	This study
mexWdown	5'-GGTGTAGCGATTGAGGTAGT-3'	
mexYRTup	5'-AGCTACAACATCCCCTA-3'	Chuanchuen et al. (2008)
mexYRTdown	5'-AGCACGTTGATCGAGAAG-3'	
oprDup	5'-TCCAAGACCATGCTGAAG-3'	This study
oprDdown	5'-GCTGAGGTTATCGGTGATT-3'	
mexXY deletion		
mexYKOup	5' GAGCAGATCGATCCGATCTACGTGAA 3'	Chuanchuen et al. (2008)
mexYKOdown	5' CAGGG CGAGG AACAC GATCA ACAC 3'	
Gm-up	5'-TGGAGCAGCAACGATGTTAC-3'	[20]
Gm-down	5'-TGTTAGGTGGCGGTACTTGG-3'	
Mutations		
mexZXup	5'-CGCAGAATTCCCGGCGTCCGC-3'	[21]
mexZXdown	5'-GCAAGCTTCTGCACATCAGCGAG-3'	

ตารางที่ 3 Primers ที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

Primers	ลำดับเบส	แหล่งที่มา
rplYF144-U	5'-ATCGCCCGAACGCTGGT-3'	[21]
rplYF144-L	5'-ATGCCGGGTCTGGTCGTATTC-3'	
galUF14o-U	5'-CGAGCGCAGCCTGATTAGACT-3'	[21]
galUR1121-L	5'-ACAGCTCAGGTAGGGCGGATA-3'	
mexRUp	5'-GCATCCCAGGAAGTCGAG-3'	This study
mexRDown	5'-AGCTCGGTATTGAGGGTCAC-3'	
nfxBup	5'-CACCGTCAGGACCTCCAC-3'	This study
nfxBdown	5'-GCCGGTGAGGACTGATCTT-3'	
mexT1up	5'-CAGTTCGAAGCCGAGACC-3'	This study
mexT1down	5'-AATAGTCGTCGAGGGTCAGC-3'	
mexT2up	5'-ATCTCCACCGCCATGAGTC-3'	This study
mexT2down	5'-AGCGGTTGTTTCGATGACTTC-3'	
mexLup	5'-AAAGGCCTGGCTCACCTC-3'	This study
mexLdown	5'-GCCTACTGGGTCGAGCACT-3'	
mexZ2013up	5'-CGCTGGTGATGCCGATAG-3'	This study
mexZ2013down	5'-GCCTGTGCGGTGCTCTACATC-3'	
AMG-resistance gene		
aadA1-F	5'-CTCCGCAGTGGATGGCGG-3'	[22]
aadA1-R	5'-GATCTGCGCGCAGGCCA-3'	
aadA2-F	5'-CATTGAGCGCCATCTGGAAT-3'	[22]
aadA2-R	5'-ACATTTTCGCTCATCGCCGGC-3'	
aadB-F	5'-CTAGCTGCGGCAGATGAGC-3'	[23]
aadB-R	5'-CTCAGCCGCCTCTGGGCA-3'	
strA-F	5'-TGGCAGGAGGAACAGGAG G-3'	[23]
strA-R	5'-AGGTCGATCAGACCCGTG C-3'	
strB-F	5'-GCGGACACCTTTTCCAGCCT-3'	[23]
strB-R	5'-TCCGCCATCTGTGCAATGCG-3'	
aph3IIbup	5'-GAACGAAACCCAGAGCGACGG-3'	[23]
aph3IIbdown	5'-CAATCGATGAAGCCGCTGAAG-3'	
ant2Iaup	5'-TGGAGCAGCAACGATGTTACGC-3'	[23]
ant2Iadown	5'-CCACTGGTGGTACTTCATCGG-3'	
aac3Iaup	5'-CTGACCAAGTCAAATCCATGCGGG-3'	[23]
aac3Iadown	5'-CACTGCGGGATCGTCACCG-3'	

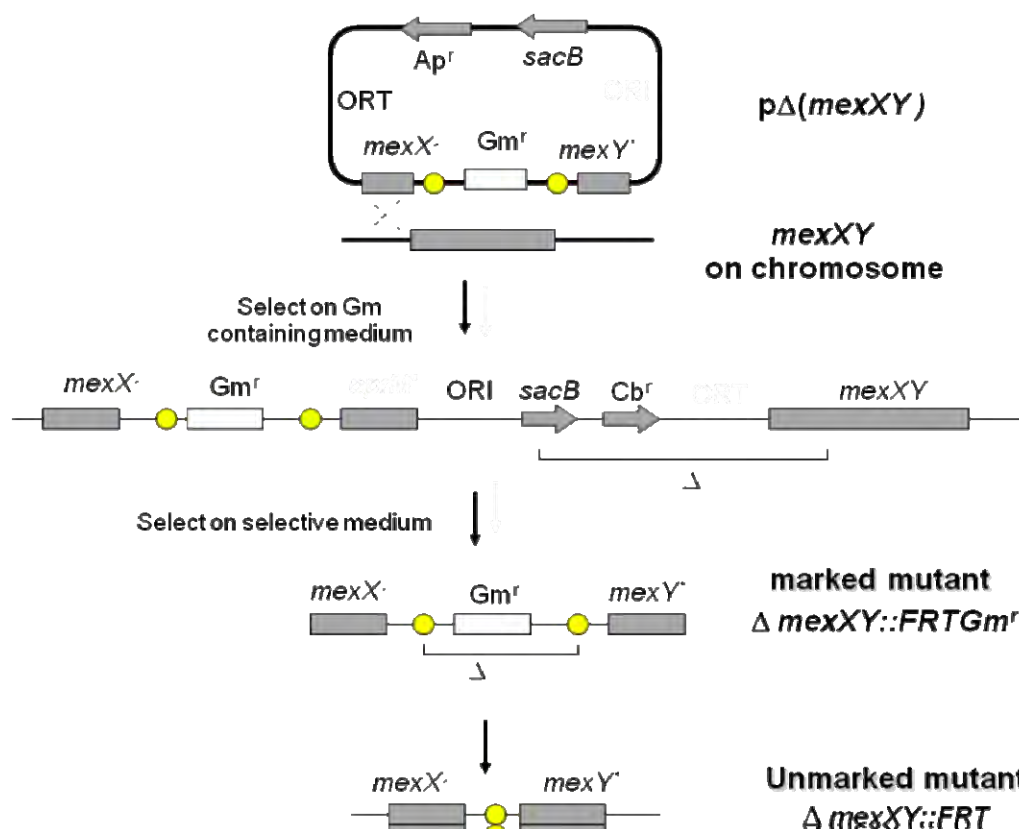
ตารางที่ 3 Primers ที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

Primers	ลำดับเบส	แหล่งที่มา
aac6llbup	5'-CCGAAGAAGGAGTGACGCCG-3'	[23]
aac6llbdown	5'-GCGCAAACCGTTACCAACGG-3'	
Multiplex RT-PCR		
mexBMRTup (155 bp)	5'-ACTTCTTCAGCTTCAAGGAC-3'	This study
mexBMRTdown	5'-GAGCATGAGGAACCTGTTG-3'	
mexDRTup (250 bp)	5'-CTACCCTGGTGAAACAGC-3'	This study
mexRTDdown	5'-AGCAGGTACATCACCATCA-3'	
mexYMRTup (445 bp)	5'-GCTACAACATCCCCCTATGAC-3'	This study
mexYMRTdown	5'-AACTGGCGGTAGATGTTG-3'	
mexFRTup (350 bp)	5'-CATCGAGATCTCCAACCT-3'	This study
mexFRTdown	5'-GTTCTCCACCACCGAT-3'	

จากการทดลอง 2 ครั้ง ($n=6$, $SD \leq 0.1$) ค่าเฉลี่ย cDNA copy number จะ normalize ด้วย the average *rpsL* cDNA copy number ของตัวอย่างเดียวกัน ผลการทดลองที่ได้เป็น the relative levels of expression ของ clinical strains เปรียบเทียบกับ PAO1 ส่วน standard curve ($r^2 \geq 0.990$) ได้จากการ plot ระหว่าง the average Ct values กับค่า log ของความเข้มข้นของ DNA template.

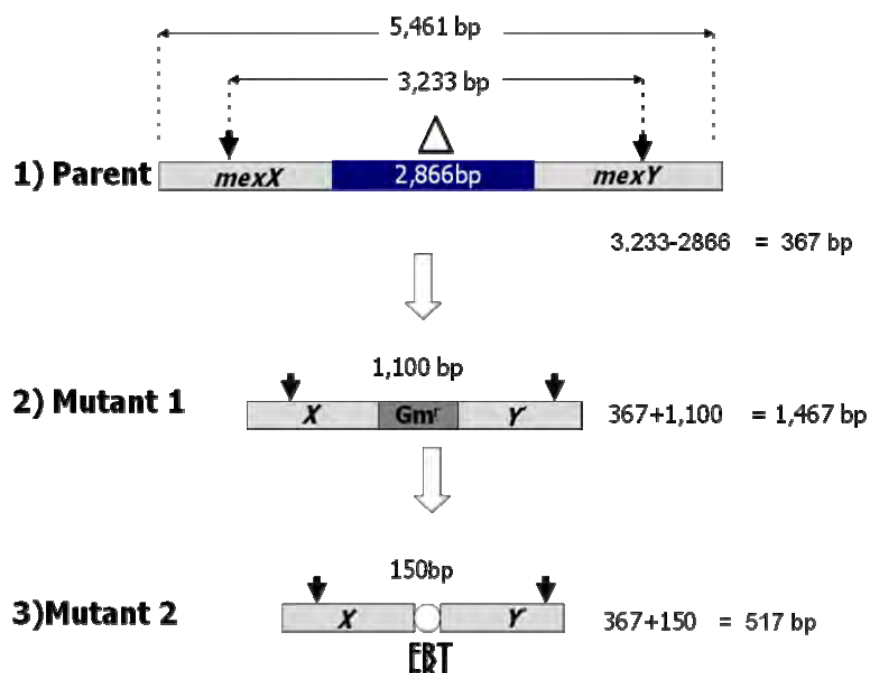
การตัดยีน *mexXY* ด้วยเทคนิค *gene knockout*

ทำการตัดยีน *mexXY* ใน clinical isolates [15, 24] (รูปที่ 1 และ 2) กล่าวโดยย่อดังนี้ นำพลาสมิด pPS1221 จาก Sm10lacIq เข้าสู่ clinical isolates ด้วยเทคนิค Biparental mating คัดเลือก transconjugants บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Vogel-Bonner minimum medium (VBMM) ที่มีทั้งน้ำตาลซูโครส 5 % และ gentamycin 50 µg/ml ทำการทดสอบยืนยันรูปแบบปรากฏ (phenotype) อีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ VBMM ที่มีน้ำตาลซูโครส 5 % หรือ carbenicillin 200 µg/ml หรือ gentamycin 50 µg/ml เพื่อให้ได้โคโลนีที่เจริญเติบโตได้ใน gentamycin และน้ำตาลซูโครสแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน carbenicillin ซึ่งเป็น marked mutant จากนั้นทำการตัด gentamycin ออกด้วยเทคนิค Flp-recombinase excision โดยนำพลาสมิด pFLP₂ จาก Sm10 เข้าสู่ marked mutant ด้วย Biparental mating คัดเลือก transconjugants บนอาหารเลี้ยงเชื้อ VBMM ที่มี carbenicillin 200 µg/ml และทดสอบหาโคโลนีที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน gentamycin 50 µg/ml แต่สามารถเจริญเติบโตได้ใน carbenicillin จากนั้นทำการกำจัด pFLP₂ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ VBMM ที่มีน้ำตาลซูโครส 5 % คัดเลือกให้ได้โคโลนีที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ใน gentamycin และ carbenicillin แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำตาลซูโครส 5 % เรียก โคโลนีที่ได้นี้ว่า unmarked mutant ซึ่งยีน *mexXY* ได้ถูกตัดออกไปจากโครโมโซมและไม่มี antibiotic resistance markerหลงเหลืออยู่ ทำการยืนยันความถูกต้องของการตัดยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primers mexYKUp/mexYKDown และ Gm-up/down

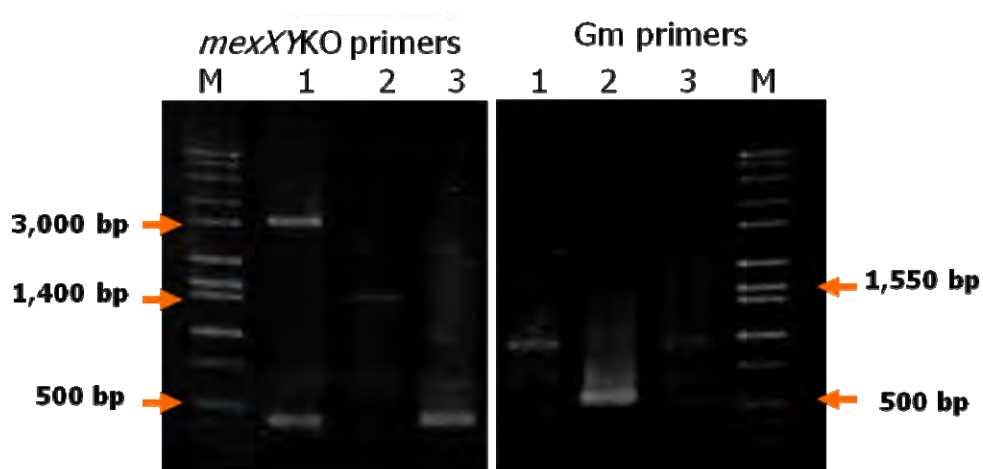


รูปที่ 1 การตัด *mexXY* บนโครโมโซมด้วยเทคนิค gene replacement pPS1221 ซึ่งเป็น suicide plasmid pEX18AP ที่มี *mexXY* ที่ถูกตัดออกและแทรกด้วย Gm^r cassette ถูกนำเข้าสู่ *Pseudomonas* clinical isolates ด้วยเทคนิค biparental จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่พลาสมิด integrate เข้าสู่โครโมโซมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ VBMM ที่มี gentamycin โดย Marked mutants เป็นโคโลนีที่มี $\Delta 1$ เกิดขึ้นจะสามารถเจริญเติบโตได้บน gentamycin (Gm^r) และ Sucrose (Sucrose) ในขณะที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บน carbenicillin (Cb^s) จากนั้นตัด Gm^r cassette ออกเพื่อให้ได้ unmarked $\Delta mexXY$ null mutant ด้วย FLP-recombinase excision ($\Delta 2$).

A



B



รูปที่ 2 การตัด *mexXY* operon A ขนาดและชิ้นส่วนของ *mexXY* ที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการทำ gene knockout ที่ยืนยันได้ด้วยเทคนิค PCR 1) *mexXY* มีขนาด 5,461 bp และ *mexXYKO*-up/down primers จะ amplify ได้ PCR products ขนาด 3,233 bp เมื่อถูกตัดออก 2,866 bp จะเหลือ 367 bp 2) ส่วนที่ถูกตัดจะถูกแทนด้วย *Gm^r* cassette ขนาด 1,100 bp ได้ marked mutant (mutant 1) ที่ให้ขนาด PCR products 1,467 bp 3) เมื่อ *Gm^r* cassette ถูกตัดออกจะมีส่วนเหลือ 150 bp ได้ unmarked mutant (mutant 2) ที่ให้ขนาด PCR products 517 bp B แสดงขนาดของ PCR products ที่ amplify ด้วย *mexXYKO*-up/down primers (ซ้าย) และ *Gm*-up/down primers (ขวา) ซึ่งเฉพาะ marked mutant เท่านั้นที่ให้ PCR products 1= parent, 2 = marked mutant และ 3 = unmarked mutant คำย่อ: M = Molecular weight marker, *Gm^r* = gentamycin resistance cassette

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ (transformation)

ทำการเลี้ยงเชื้อใน LB 4 มล. ที่ 37°C ในตู้บเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า (shaking incubator) ที่ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 1 คืน ขั้นตอนต่อจากนี้ ยกเว้นการปั่นเหวี่ยงให้ทำบนน้ำแข็ง เก็บตะกอนเซลล์จาก culture ปริมาตร 1 มล. ใน eppendorf tube ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 30 วินาที ล้างเซลล์ด้วยการเติม 1 mM MgCl₂ ที่เย็นปริมาตร 1 มล. และปั่นเหวี่ยงเช่นเดิม จากนั้นละลายเซลล์ใน TG Salt ที่เย็น (75 mM CaCl₂, 6mM MgCl₂, 15% glycerol) ปริมาตร 1 มล. และแช่ไว้ในน้ำแข็งนาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 x g นาน 30 วินาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ สุดท้ายละลายเซลล์ใน TG Salt 200 µl และเก็บไว้บนน้ำแข็งจนกว่าจะใช้ ในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ให้ใช้ competent cells 100 µl โดยใส่ลงในหลอดทดลองแก้วที่แช่ไว้ในน้ำแข็ง เติมพลาสมิด 3-5 µl และแช่ในน้ำแข็งต่ออีก 15 นาที จากนั้นนำส่วนผสมไปทำ heat-shocked โดยแช่ใน waterbath หรือ heatblock ที่ 42°C นาน 2 นาที เติม LB 500 µl ทันที และนำไปปั่นที่ 37°C ใน shaking incubator นาน 1 ชม. หลังจากนั้นคัดเลือก transformants บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมและอบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C นาน 20-24 ชม.

การทำ Multiplex Reverse Transcription PCR (Multiplex RT-PCR)

ตรวจการแสดงออกของระบบ Multidrug Efflux System ที่มีความสำคัญใน clinical isolates ทั้ง 4 ระบบ ได้แก่ ระบบ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY-OprM โดยใช้วิธี Multiplex RT-PCR ดังนี้

สกัด Total RNA จาก *P. aeruginosa* laboratory strain ได้แก่ strain PAO1, PAO200, PAO200-2, PAO238, PAO7H, PAO7H1A, PAO255, PA3579, PAO267 และ PAO280 และ clinical isolates โดยใช้ Total RNA Extraction Mini Kit (RBC Bioscience, New Taipei, Taiwan) นำ RNA ที่ได้มากำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย DNaseI (Fermentus®, Mainz, Germany) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย RNA 1 µg, 10X Reaction Buffer with MgCl₂ 1 µl, DNaseI 1 µl (1 u/µl) เติมนuclease free water จนปริมาตรเป็น 10 µl จากนั้น incubate ที่ 37°C นาน 30 min และหยุดปฏิกิริยาด้วย 50 mM EDTA 1 µl incubate 65°C นาน 10 min จากนั้นเปลี่ยน mRNA เป็น cDNA ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการศึกษาด้วย ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, WI, USA) โดยใช้ reverse primer ของยีนเป้าหมายดังนี้ เตรียม RNA และ primer ด้วย DNaseI treated RNA 0.5 µg ผสมกับ reverse primers ของระบบ Mex ที่ต้องการตรวจการแสดงออก 4 ชนิด ได้แก่ mexBRTdown, mexDRTdown, mexFRTdown และ mexYMRTdown อย่างละ 10 pmol เติมนuclease-free water จนครบ 5 µl incubate 70°C, 5 min quick-chill 4°C 5 min and hold on ice นำ RNA และ primers ที่เตรียมไว้มาผสมกับ reverse transcription mix ซึ่งประกอบด้วย ImProm-IITM 5X Reaction Buffer 4 µl, 25 mM MgCl₂ 2 µl, dNTP mix (10 mM each dNTP) 1 µl, ImProm-IITM Reverse Transcriptase 1 µl, Nuclease-free water qs. to 15 µl ปรับอุณหภูมิเพื่อทำปฏิกิริยาใน thermocycler ดังนี้ Anneal at 25°C 5 min, Extend 45 min of 45°C, Heat-inactivate ImProm-IITM Reverse Transcriptase 70°C for 15 min

นำ cDNA ที่ได้มาทำ multiplex PCR ซึ่งปฏิกิริยา 30 µl ประกอบด้วย cDNA template 5 µl (total concentration of cDNA approximately between 100-2000 ng/ µl of template), 10 µl

of KAPATaq ReadyMix DNA polymerase (Kapabiosystems, MA, USA), 10 pmol of each primer, Nuclease Free Water qs. to 30 μ l โดยใช้ specific primers จากนั้นทำปฏิกิริยาใน thermocycler ดังนี้ Predenaturation 95°C 5 min follow by 30 cycles of Denaturation 95°C 45 s, Annealing 54°C 45 s and Extension 72°C 1 min ตามด้วย Final extension 72°C 10 min ตรวจดู PCR products ที่ได้บน 2% agarose gel (Bioexpress, Utah, USA) ใน 1XTris-Acetate-EDTA (TAE) buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V นาน 40 min

เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบสำหรับ Multiplex RT-PCR ได้แก่

Strain	Mex expression
PAO1	ABM,XY
PAO200	PAO1 Δ ABM
PAO200-2	PAO200C ⁺ D ⁺ J ⁺
PAO7H1A	Δ ABM E ⁺ F ⁺ N ⁺
PAO255	PAO7H1A Δ EFN
PAO267	Δ ABMX ⁺ Y ⁺
PAO280	Δ ABM Δ XY

โดยทำการทดสอบใน Clinical isolates จำนวน 13 isolates ที่มีการแสดงออกของระบบทั้ง 4 แตกต่างกัน

Repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep-PCR)

ทดสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อด้วย repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep-PCR) [25] โดยใช้ ERIC primers [26, 27]

ผลการงานวิจัย

1. ระบบ *mexXY* และกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัขและแมว

ความไวต่อยาปฏิชีวนะ

Pseudomonas aeruginosa ที่ได้จากสุนัขและแมว 14 isolates พบว่ามีการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ทุก isolates โดยเปอร์เซ็นต์ของการดื้อยาแต่ละชนิด (ตารางที่ 4) เชื้อทั้งหมดดื้อต่อ spectinomycin kanamycin และ neomycin เชื้อที่ดื้อต่อ gentamycin และ tobramycin มีจำนวน 5 และ 3 isolates ตามลำดับ โดยไม่มีเชื้อตัวใดเลยที่ดื้อต่อ amikacin

ตารางที่ 4 MICs, transcription level of *mexY* and PA5471 and mutations in the *P. aeruginosa* clinical isolates and their corresponding Δ *mexXY* derivatives

Strains	MIC(breakpoint) (μ g/ml) ^a							Transcription level		Mutations		AMG-modifying enzyme
	AMK(64)	GEN(8)	KAN(64)	NEO(10)	STR(64)	SPC(128)	TOB(8)	<i>mexY</i>	PA5471	<i>mexZ-mexX</i> ^{b,c}	<i>rplY</i>	
PAO1	8	1.6	64	16	16	512	1	1	1	-	-	-
PA049	2	0.2	32	4	8	512	0.5					-
PAJ226	8	2										
PAJ262	0.5	<0.25	256	32	32	2048	8	24	6	A(-112)-G	G-367-T(Ala-123-Ser)	<i>aadB, aac(3')-Ia, strAB</i> ND
			32	16	4	128	1					
PAJ227	2	4										
PAJ264	0.25	1	8	4	64	2048	4	191	16	-	-	-
			2	0.5	16	256	0.5					-
PAJ229	8	4										
PAJ266	1	0.5	256	128	128	1024	2	4.7	1	-	-	<i>aadB, aac(3')-Ia</i> ND
			64	8	8	128	0.5					
PAJ230	8	4										
PAJ268	1	0.5	128	16	64	1024	2	26	16	-	-	<i>aadA2, aac(3')-Ia</i> ND
			32	4	4	256	0.25					
PAJ232	4	4										
PAJ270	2	1	128	16	32	1024	128	0.03	28	-	-	<i>aadA1, aadB, aac(3')-Ia</i> ND
			64	8	32	256	16					
PAJ234	8	8										
PAJ272	1	1	128	128	512	2048	2	6	13	-	-	<i>aadB, aac(6')-IIa</i> ND
			64	16	128	256	1					
PAJ239	8	2										
PAJ274	2	0.5	128	8	128	1024	1	21	2	-	-	-
			64	0.5	8	256	0.5					-
PAJ240	16	8										
PAJ277	2	ND	256	128	128	2048	4	3	1	A(-112)-G	-	-
			64	32	64	512	1					-
PAJ245	4	4										
PAJ276	0.5	<0.25	256	32	64	2048	0.5	6	2	-	G-367-T(Ala-123-Ser)	<i>aadA2, aac(3')-Ia</i> ND
			64	8	8	128	0.25					
PAJ228 ^d	4	256										
			128	8	512	1024	256	6	12	C(-11)-G, G(-57)-A, A(-88)-T, G(-99)-T, G(-106)-C, A(-112)-G	-	<i>aadB, aadA1, aadA2, aac(3')-Ia, strAB</i>
PAJ233 ^d	8	8										
PAJ235 ^d	16	128	128	32	64	1024	1	1	86	-	-	<i>aadB, aac(3')-Ia</i>
PAJ238 ^d	8	4	256	16	512	1024	4	8	19	G(-57)-A, A(-112)-G	-	<i>aadA2, strAB</i>
			128	32	512	1024	1	21	1	A(-112)-G	-	-

Abbreviations and concentration ranges (in parenthesis): AMK, amikacin (1-2048 µg/ml); GEN, gentamicin (1-256 µg/ml); KAN, kanamycin (1-2048 µg/ml); NEO, neomycin (1-256 µg/ml); STR, streptomycin (1-2048 µg/ml); SPC, spectinomycin (1-2048 µg/ml); TOB, tobramycin (1-128 µg/ml)

ND, not detected

^aValues in boldface indicate MICs for the parent strains that are at least 4-fold different from those for the corresponding $\Delta mexXY$ derivatives

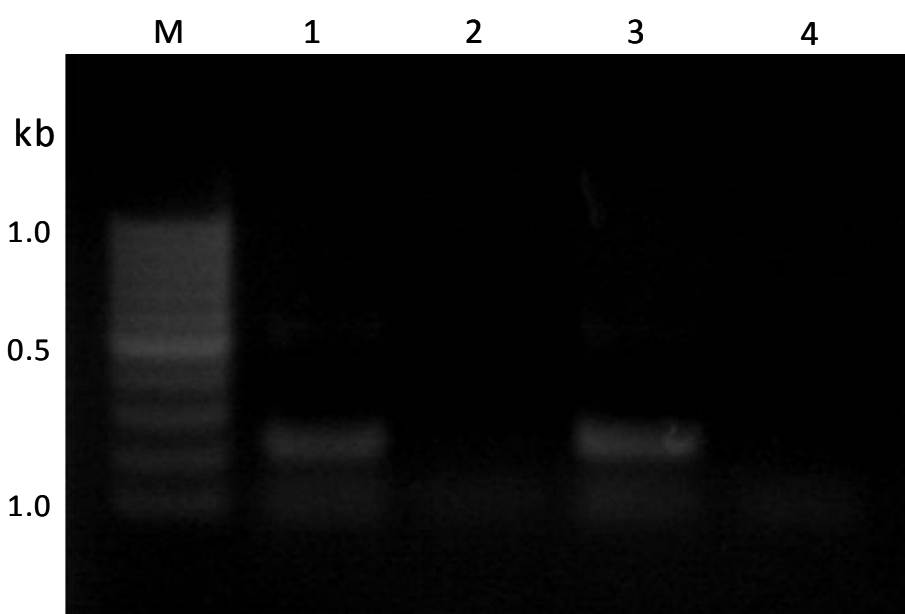
^b*mexZ-mexX* intergenic region

^cNegative number indicates the positions of base pair changes relative to the first nucleotide of the *mexX* ATG start codon

^dDeletion of the *mexXY* operon was not successful.

การแสดงออกของระบบ *MexXY* ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัขและแมว

เนื่องจากการแสดงออกของ *MexXY* อาจเป็นแบบเหนี่ยวนำ (inducible expression) ด้วยสารที่เป็น substrates หรือแบบต่ำๆตลอดเวลา (constitutive expression) ดังนั้นจึงตรวจการแสดงออกของระบบในเชื้อทั้ง 14 isolates ก่อนทำการศึกษาในขั้นต่อไป โดยตรวจ transcription ของยีน *mexY* ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า clinical isolates ที่แยกได้จากสุนัขและแมวทั้งหมด PCR product ขนาดประมาณ 150 bp เฉพาะปฏิกิริยาที่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase แสดงว่า มีการแสดงออกของระบบ *MexXY* อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในขั้นนี้ ไม่ได้แสดงว่า *MexXY* เป็นกลไกของการดื้อต่อ aminoglycosides ในเชื้อเหล่านี้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาขั้นต่อไป (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การแสดงออกของ *mexY* ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัขและแมว ตรวจด้วยวิธี RT-PCR แสดงเฉพาะผลการทดสอบในเชื้อบางตัว M=marker, 1=PAJ229RT+, 2=PAJ229RT-, 3=PAJ230RT+, 4=PAJ230RT- โดย RT+ และ RT- หมายถึง มีและไม่มีเอนไซม์ reverse transcriptase ตามลำดับ

ก เพื่อศึกษาบทบาทของ *MexXY* ต่อการดื้อ aminoglycosides ได้ทำการตัด *mexXY* ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัขและแมวทั้ง 14 isolates ซึ่งเชื้อทุกตัวมีการแสดงออกของระบบ *MexXY* จึงสามารถนำมาศึกษาด้วยตัดชุดยีนได้ โดยสามารถ delete ชุดยีน *mexX* และ *mexY* และกำจัด gentamicin-resistance marker ได้ mutant 2 ที่ไม่มี gentamicin-resistance marker ($\Delta(mexXY)::FRT$) จำนวน

8 isolates ในขณะที่ได้ mutant 1 ที่ไม่มียีน *mexXY* แต่ยังคงมียีนควบคุมการดื้อต่อ gentamycin ที่เป็น marker (gentamicin-resistance marker) อยู่บนโครโมโซมระหว่างยีน *mexX* และ *mexY* ที่ถูกตัด ($\Delta(mexXY)::FRTGm^r$) จำนวน 1 isolates คือเชื้อ PAJ240 ได้ PAJ277 ดังนั้นจะไม่ศึกษาผลต่อการดื้อ gentamicin ในเชื้อตัวนี้ mutant derivatives ทุกตัวได้รับการยืนยันลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Gm-primers และ *mexXYKO* primers และให้ผลถูกต้อง เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของ aminoglycosides ของ isogenic parents และ mutant 2 พบว่าการเปลี่ยนค่า MIC อยู่ระหว่าง 2-128 เท่าลดลงจากค่า MIC ของ parents เมื่อทำ complementation tests ด้วย pAMR-1 ที่มียีน *mexXY* ให้ผลยืนยันไปในทิศทางเดียวกัน โดยค่า MIC ที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือค่า MIC ต่อ neomycin ของ PAJ239 แสดงว่า *MexXY* เป็นกลไกของการดื้อต่อ aminoglycosides ใน *P. aeruginosa* clinical isolates ที่แยกได้จากสุนัขและแมว

ผลของ $\Delta(mexXY)$ มีความแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อ โดยส่งผลให้เกิดการลดลงของค่า MIC ของ aminoglycosides 2-16 เท่า โดยเชื้อจำนวน 3 isolates (PAJ227 PAJ229 และ PAJ230) มีค่า MIC ของ aminoglycosides ลดลงทุกชนิด และเชื้อจำนวน 2 isolates (PAJ226 และ PAJ245) มีค่า MIC ของ aminoglycosides ลดลง 6 ชนิดจาก 7 ชนิดที่ทดสอบ นอกจากนี้แล้วการตัด *mexXY* ส่งผลให้เกิดการลดลงของค่า MIC ของ aminoglycosides 2-4 เท่าในเชื้อหลาย isolates เช่น ค่า MIC ของ aminoglycosides ทุกชนิดลดลงเพียง 2-4 เท่าใน PAJ277 เมื่อเทียบกับ PA240 เมื่อพิจารณาที่ aminoglycosides แต่ละชนิด พบว่าผลของ $\Delta(mexXY)$ ต่อค่า MIC ของ aminoglycosides ชนิดเดียวกันในเชื้อต่าง isolates มีความแตกต่างกัน เช่น $\Delta(mexXY)$ ไม่ทำให้ค่า MIC ของ streptomycin ใน PAJ232 และ PAJ240 เปลี่ยนแปลง แต่กลับลดค่า MIC ของ streptomycin ใน PAJ229 PAJ230 และ PAJ239 มากถึง 16 เท่า

$\Delta(mexXY)$ ไม่มีผลทำให้ค่า MIC ต่อ aminoglycosides ลดลงในเชื้อทุกตัวและต่อยาทุกชนิด เช่นไม่ทำให้ค่า MIC ต่อ streptomycin ของ PAJ232 เปลี่ยนแปลง แสดงว่า ยังมีกลไกอื่นๆ ที่รับผิดชอบต่อการดื้อ streptomycin ในเชื้อตัวนี้ ซึ่งพบว่าเชื้อตัวนี้มี aminoglycoside modifying enzymes คือ *aadA1* และ *aadA2* ซึ่งยีนเหล่านี้มีส่วนร่วมในการทำเชื้อดื้อยา AMG ด้วยและอาจมีกลไกอื่นๆ ที่ไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

การตรวจวัดระดับการแสดงออกของ *mexXY* และ PA5471

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ *mexXY* กับการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides เริ่มต้นด้วยการตรวจสอบว่า เชื้อที่ศึกษามีการแสดงออกของ *mexXY* หรือไม่ พบว่าเชื้อทุกตัวมีการแสดงออกของ *mexXY* เมื่อตรวจวัดระดับการแสดงออกของ *mexXY* พบว่า Ct values ของ *rpsL* ซึ่งเป็น internal control ในเชื้อทุกตัวมีค่าใกล้เคียงกันในทุกการทดลอง ระดับการแสดงออกของ *mexXY* ใน clinical isolates จำนวน 11 isolates ที่ทดสอบมีค่า 3-191 เท่าของ *mexXY* ใน PAO1 มีเชื้อ 1 isolates คือ PAJ232 มีระดับการแสดงออกของ *mexXY* ต่ำกว่า PAO1 (0.03 เท่า) และเชื้ออีก 1 isolate มีระดับการแสดงออกของ *mexXY* เท่ากับ PAO1

สำหรับการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ PA5471 ในเชื้อทุกตัว พบว่าเชื้อจำนวน 10 isolates มีตรวจวัดระดับการแสดงออกของ PA5471 สูงกว่า PAO1 โดยมีค่า 2-86 เท่า เชื้อที่มีระดับการ

แสดงออกของ *mexXY* เท่ากันมีระดับการแสดงออกของ PA5471 ที่แตกต่างกัน เช่น PAJ234 PAJ228 และ PAJ245 มีระดับการแสดงออกของ *mexXY* 6 เท่าของ PAO1 แต่ผลิต PA5471 2-13 เท่าของ PAO1 ในทำนองเดียวกัน เชื้อที่มีระดับการแสดงออกของ PA5471 เท่ากันก็ไม่ได้มีระดับการแสดงออกของ *mexXY* ที่เท่ากัน เชื้อที่มีระดับการแสดงออกของ PA5471 สูงกว่า ไม่ได้ผลิต *mexXY* มากกว่าหรือมีค่า MIC ของ aminoglycosides สูงกว่าเชื้อที่มีระดับการแสดงออกของ PA5471 ต่ำกว่า เช่น PAJ233 ไม่ได้ดื้อต่อ aminoglycosides มากกว่า PAJ288 และ PAJ235

การตรวจหาการกลายพันธุ์ใน *mexZ*, *rplY* และ *galU*

ศึกษาบทบาทของ *mexZ* ต่อการแสดงออกของ *mexXY* โดยตรวจหาการกลายพันธุ์ใน *mexZ* และ *mexZ-mexX* intergenic region ในเชื้อทุกตัว พบว่า *mexZ* ในเชื้อทุกตัวมีลำดับเบสเหมือนกับ PAO1 โดยเชื้อจำนวน 5 isolates คือ PAJ226, PAJ240, PAJ228, PAJ235 และ PAJ238 มีการกลายพันธุ์แบบ single-point mutation ใน *mexZ-mexX* intergenic region โดยการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ A(-112)G ระดับการแสดงออกของ *mexXY* ในเชื้อ 3 isolates ที่มี A(-112)G เท่ากันมีค่า 3-24 เท่าของ PAO1 โดย PAJ228 มีการกลายพันธุ์ single-point mutation มากถึง 6 แบบและมีระดับการแสดงออกของ *mexXY* เท่ากับ PAJ235 ที่มีการกลายพันธุ์เพียง 2 แบบ นอกจากนี้ PAJ227 ที่มีระดับการแสดงออกของ *mexXY* สูงสุดแต่กลับไม่มีการกลายพันธุ์ใน *mexZ-mexX* intergenic region เชื้อบางตัวที่มีลำดับเบสของ *mexZ-mexX* intergenic region เหมือนกับ PAO1 เช่น PAJ234 และ PAJ235 มีระดับการแสดงออกของ *mexXY* ใกล้เคียงกับเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ใน *mexZ-mexX* intergenic region เช่น PAJ228 และ PAJ235

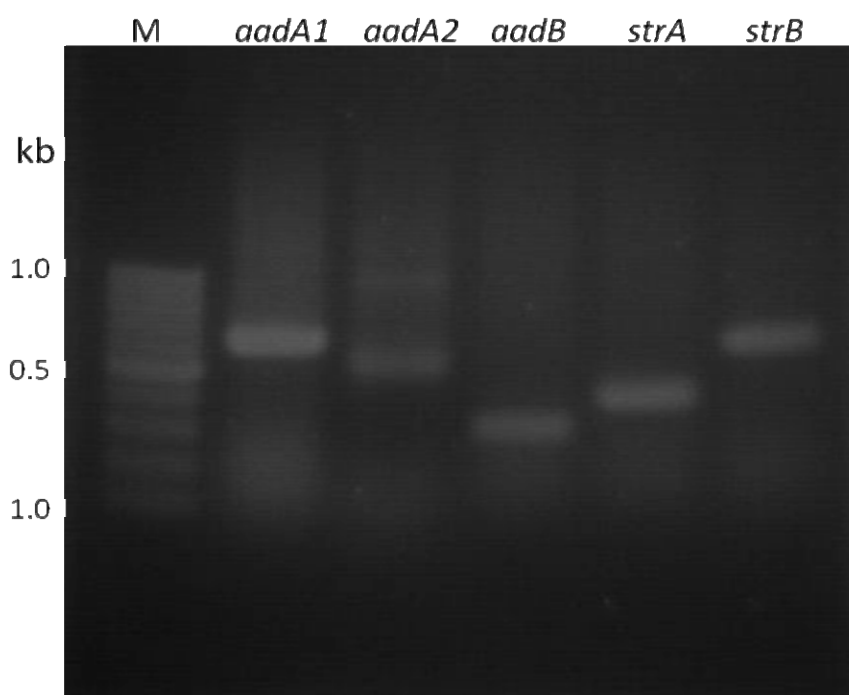
จากการตรวจหาการกลายพันธุ์ใน *galU* และ *rplY* ในเชื้อทุกตัว พบว่าเชื้อทุกตัวมีลำดับเบสของ *rplY* เหมือนกับ PAO1 มีเชื้อเพียง 2 isolates เท่านั้นคือ PAJ226 และ PAJ245 ที่มีการกลายพันธุ์แบบ G-367-T single point mutation ใน *rplY* ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนแบบ Ala-123-Ser ในโปรตีน RplY

การแสดงออกของ *nuoG*

ยีน *nuoG* อยู่บน *nuoABCDEFGHIJKLN* ดังนั้นจึงตรวจว่ายีน *nuoG* มีการแสดงออกที่ปกติหรือไม่ โดยตรวจการแสดงออกของยีน *nuoH* ด้วย RT-PCR พบว่าเชื้อทุกตัวมีการแสดงออกของยีน *nuoH*

การปรากฏของ aminoglycoside-modifying enzymes

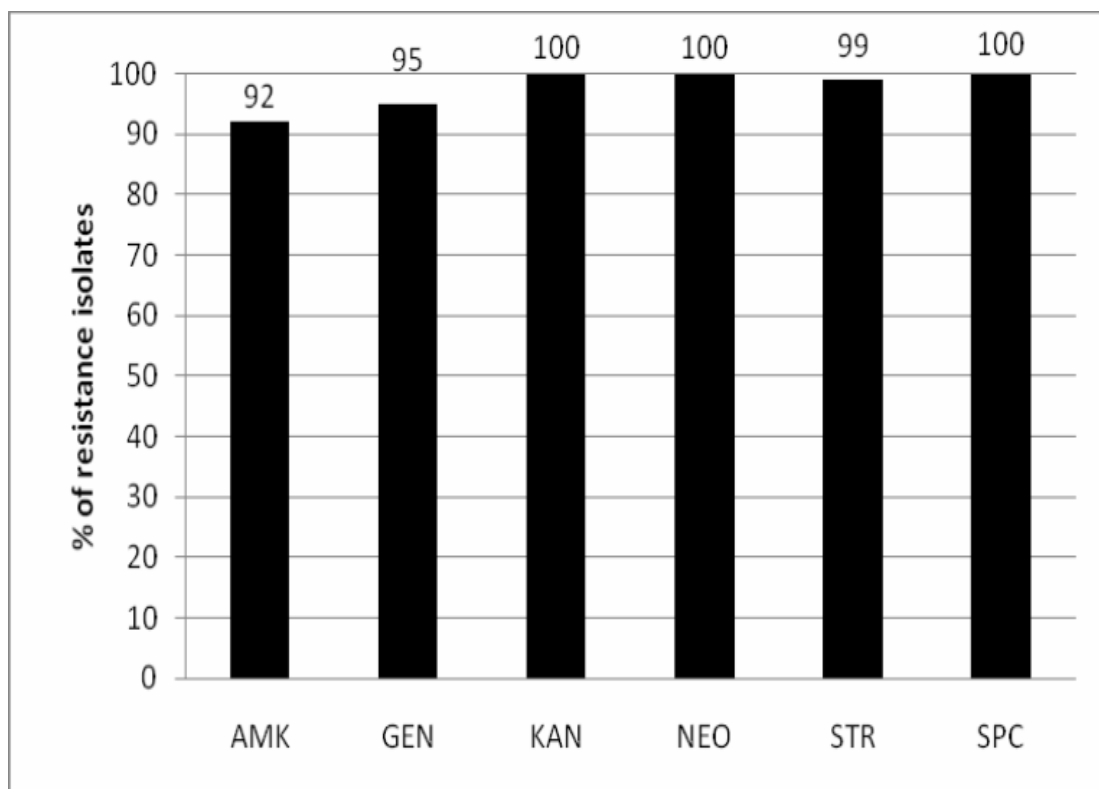
เชื้อส่วนใหญ่ยกเว้น PA227, PA238, PA239 และ PA240 มีการปรากฏของยีนควบคุม aminoglycoside-modifying enzymes เชื้อบางส่วนมียีนหลายตัวที่ควบคุมการดื้อยาชนิดเดียวกัน เช่น PAJ228, PAJ237 เป็นต้น โดยยีนที่พบมากที่สุดคือ *aadB* (7 isolates) และ *aac(3)-Ia* (7 isolates). ไม่พบการปรากฏของยีน *aph(3')-IIb*, *ant(2'')-Ia* และ *aac(6')-IIb*.



รูปที่ 4 PCR product ที่ได้จากการตรวจการปรากฏของยีนควบคุม aminoglycoside-modifying enzymes (บางชนิด) M = DNA molecular marker

การดื้อยาของเชื้อ

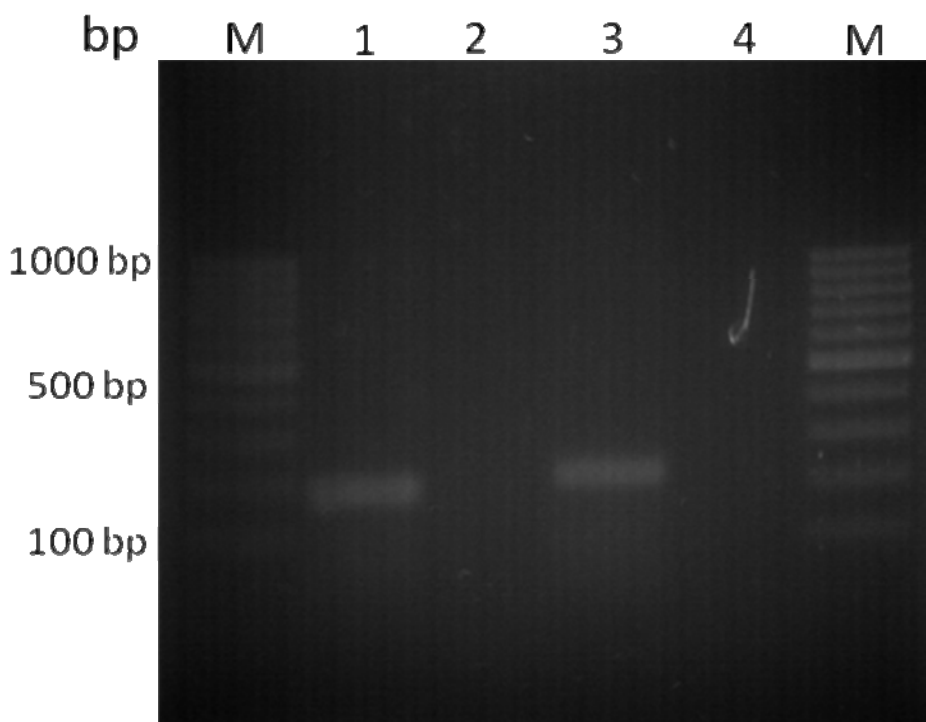
Pseudomonas aeruginosa ที่ได้จากผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 100 isolates พบว่ามีการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ทุก isolates โดยอัตราการดื้อยาแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 4 โดยคัดเลือกเชื้อจำนวน 30 isolates มาทำการศึกษาในหัวข้อนี้



รูปที่ 5 กราฟแสดงอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่ม aminoglycosides ของ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ได้จากผู้ป่วย ($n=100$)

การตรวจวัดระดับการแสดงออกของ *mexXY* และ *PA5471*

เชื้อที่ทดสอบทั้งหมดจำนวน 30 isolates พบการแสดงออกของระบบ *mexXY* จำนวน 29 isolates (96.67%)



จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนยีน *galU* โดยเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งหมด 30 isolates กับ PAO1 พบว่า เชื้อที่ศึกษาทั้งหมด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนยีน *galU*

จากการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน *rpLY* ในเชื้อทั้งหมด 30 isolates และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้ออ้างอิง PAO1 พบเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสทั้งหมด 6 isolates โดยการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสทั้งหมดเกิดขึ้นในรูปแบบเดียวกันคือ การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสชนิด G เป็น T ที่ตำแหน่ง 367 ของยีน *rpLY* (G367-T) ซึ่งมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโนจาก Ala เป็น Ser ในตำแหน่งที่ 123 (Ala123-Ser) และค่าความไวต่อยาปฏิชีวนะแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนยีน *rplY* และค่า MIC ของยาในกลุ่ม aminoglycosides

Strain	Amino acid change in RplY	MIC (µg/ml)						
		AMG	GEN	KAN	NEO	STR	SPC	TOB
PAO1	-	8	16	64	16	16	512	4
PAJ114	Ala123-Ser	>2048	>256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ128	Ala123-Ser	>2048	>256	>256	256	>256	>256	>256
PAJ133	Ala123-Ser	2048	256	>256	>256	4	>256	32
PAJ146	Ala123-Ser	512	256	>256	64	256	>256	32
PAJ208	Ala123-Ser	32	8	256	128	>256	>256	8
PAJ212	Ala123-Ser	512	256	>256	>256	>256	>256	>256

AMK, amikacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin, STR; streptomycin; SPC, spectinomycin, TOB, tobramycin

การแสดงออกของ *nuoH*

ตรวจการแสดงออกของยีน *nuoH* พบว่าเชื้อจำนวน 28 isolates มีการแสดงออกของ *nuoH* โดยมีเชื้อจำนวน 2 isolates ไม่มีการแสดงออกของยีนดังกล่าว ซึ่งเชื้อทั้งสองดื้อต่อ aminoglycosides และค่าความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแสดงในตารางที่ 6 และการแสดงออกของยีน *nuoH* แสดงในรูปที่ 6

ตารางที่ 6 ค่า MIC ของยาในกลุ่ม aminoglycosides ในเชื้อที่ไม่พบการแสดงออกของยีน *nuoH*

Strain	Expression of <i>nuoH</i>	MIC (µg/ml)						
		AMG	GEN	KAN	NEO	STR	SPC	TOB
PAO1	Yes	8	16	64	16	16	512	4
PAJ114	No	>2048	>256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ123	No	2048	256	>256	256	>256	>256	>256

AMK, amikacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin, STR; streptomycin; SPC, spectinomycin, TOB, tobramycin

การปรากฏของ aminoglycoside-modifying enzymes

จากเชื้อที่ทดสอบทั้งหมดจำนวน 30 isolates พบยีน *aph (3')-IIb* ในอัตราสูงสุดคือ 100% ตามด้วย *aadB* จำนวน 26 isolates (86.67%) และ *aadA1* จำนวน 22 isolates (73.33%) โดยพบการปรากฏของ *aadA2*, *strA* และ *strB* ในอัตราเดียวกัน 17 isolates (56.67%) เชื้อจำนวนครึ่งหนึ่ง (50%) มี *ant(2'')-Ia* พบการปรากฏของยีน *aac(3')-Ia* และ *aac(6')-IIa* ในเชื้อจำนวน 9 isolates (30%) และ 8 isolates (26.67%) ตามลำดับ ไม่พบการปรากฏของยีน *aac(6')-IIb*

Occurrence of aminoglycoside modifying enzymes

ตารางที่ 7 AMG-resistance mechanisms in the *P. aeruginosa* isolates from patients (n=30)

Group	AMG-resistance mechanism ^a			No.(%)	AMG-modifying enzyme encoding gene ^b	AMG-resistance pattern ²
	<i>mexY</i>	<i>nueH</i>	<i>rplY</i>			
I	+	+	-	23(76.7)	<i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, aadA2, strA-strB</i> (3) <i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA, strA-strB</i> (3) <i>aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1,aadA2, strA-strB</i> (3) <i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, aadA2</i> <i>aac(3')-Ia, aac(6')-IIa, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1</i> <i>aac(6')-IIa, aph(3')-IIb, aadA1,aadA2, strA-strB</i> <i>aac(6')-IIa, aph(3')-IIb, aadB, aadA1, strA-strB</i> <i>aph(3')-IIb, aadB, aadA1,aadA2, strA-strB</i> <i>aac(6')-IIa, aph(3')-IIb, aadB, aadA1,aadA2</i> (3) <i>aph(3')-IIb, aadB, aadA1, strA-strB</i> <i>aac(6')-IIa, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB</i> <i>aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1</i> <i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, aadB</i> <i>aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB(3) AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB(3) AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC -TOB(3) AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB(2) AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB AMK-KAN-NEO-STR-SPC-TOB AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB(2) AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB KAN-NEO-STR-SPC AMK-GEN-KAN-NEO-SPC-TOB
II	+	+	Ala123-Ser	5(16.7)	<i>aph(3')-IIb, aadB, aadA2, strA-strB</i> (2) <i>aph(3')-IIb, aadB, aadA1, aadA2</i> <i>aph(3')-IIb, aadB, aadA1, strA-strB</i> <i>aph(3')-IIb</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB(2) AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB KAN-NEO-STR-SPC AMK-GEN-KAN-NEO-SPC-TOB
III	+	-	-	1(3.3)	<i>aac(6')-IIa, aph(3')-IIb, aadA1, aadA2</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
IV	-	-	Ala123-Ser	1(3.3)	<i>aph(3')-IIb, aadA2, strA-strB</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB

Abbreviation: AMI, amikacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; STR, streptomycin; SPC, spectinomycin; TOB, tobramycin

^a +, expressed; -, not expressed

^b The patterns represented by only one isolate are shown without number

ความสัมพันธ์ระหว่างยีนดื้อยา (*resistance genes*) และลักษณะปรากฏของการดื้อยา (*resistance phenotype*)

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มี strong-positive associations ระหว่างยีน *ant(2'')-Ia* และการดื้อยา gentamicin (OR=11.83) และยีน *aadA2* กับการดื้อยา amikacin (OR= 17.77) ($P<0.05$) ซึ่งเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างยีนดื้อยาพบว่า มีความสัมพันธ์ในเชิงบวก (positive associations) ($P<0.05$) ระหว่างยีนแต่ละคู่ดังนี้ *aadB/aadA1* (OR=6.40), *aadA1/aadA2* (OR=4.42), *aadA2/strA-strB* (OR=2.8) และ *ant(2'')-Ia/strA-strB* (OR=2.8) มีเพียงแค่อีนเดี่ยวคือ *aac(6')-IIa* ที่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบ (negative association) ($P<0.05$) กับยีน *aadB* (OR=0.29)

3 การปรากฏของ aminoglycoside-modifying enzyme encoding genes ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัข แมวและผู้ป่วย

สำหรับอัตราการปรากฏของ aminoglycoside-modifying enzyme encoding genes ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัข แมวดูใน 2.3.1 ส่วนเชื้อที่แยกได้จากคนทำได้เสร็จสิ้นแล้วดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 อัตราการปรากฏของ aminoglycoside-modifying enzyme encoding genes ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากคน (n=100)

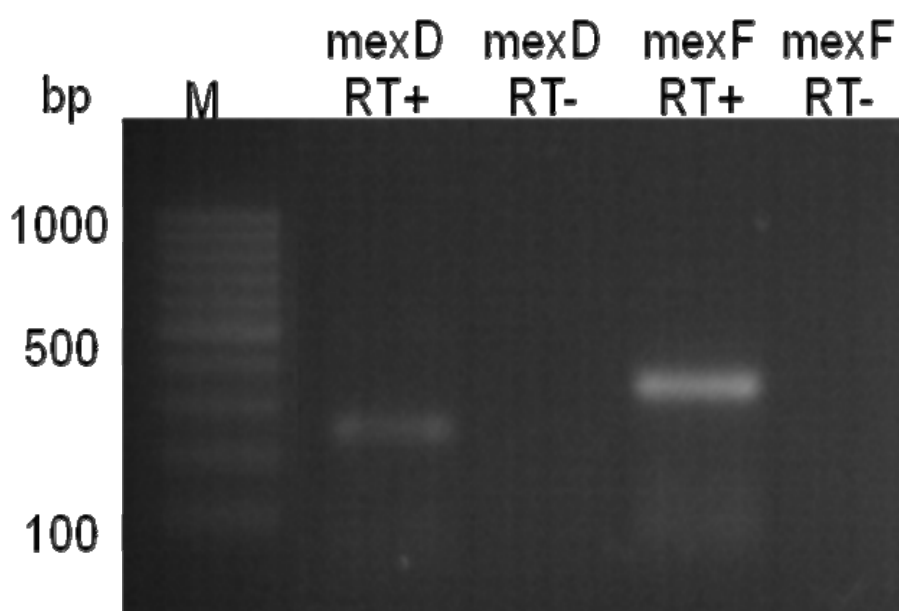
Gene	No of isolates (%)
<i>aadA1</i>	84 (84)
<i>aadA2</i>	67 (67)
<i>aadB</i>	84 (84)
<i>aac(3')-Ia</i>	40 (40)
<i>aac(6')-IIa</i>	27 (27)
<i>aac(6')-IIb</i>	0
<i>aph(3')-IIb</i>	57 (57)
<i>ant(2'')-Ia</i>	72 (72)
<i>strA</i>	70 (70)
<i>strB</i>	70 (70)

4. การแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ และ MexEF-OprN ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัข แมวและผู้ป่วย

จากการตรวจการแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ และ MexEF-OprN ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 30 isolates พบการแสดงออกของยีน *mexD* ในเชื้อจำนวน 20 isolates (66.67%) พบการแสดงออกของยีน *mexF* ในเชื้อจำนวน 21 isolates (70%) โดยมีเชื้อจำนวน 24

isolates ที่มีการแสดงออกอย่างน้อยหนึ่งระบบ และจำนวน 17 isolates (56.67%) แสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 9

เมื่อตรวจการแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ และ MexEF-OprN ในเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสุนัขและแมวจำนวน 14 isolates พบว่า เชื้อทั้งหมดมีการแสดงออกของระบบ MexEF-OprN แต่ไม่พบการแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ ในเชื้อตัวใดเลย



รูปที่ 8 การตรวจการแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ และ MexEF-OprN ด้วยเทคนิค RT-PCR RT+ และ RT- หมายถึง มีและไม่มีการใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เมื่อตรวจด้วยวิธี RT-PCR ตามลำดับ M, molecular weight marker

ตารางที่ 9 การแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ และ MexEF-OprN ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (n=30)

Strain	Expressed MEX		MIC(μ g/ml)															
	MexCD-OprJ	MexEF-OprN	AMK	ATM	CAR	CEF	CHP	CIP	ERY	GEN	KAN	NEO	PIP	STR	SPC	TET	TRI	TOB
PAJ107	1	1	>2048	64	2048	4	>512	64	>512	>256	>256	128	256	>256	>256	>256	256	>256
PAJ111	1	1	2048	32	2048	8	>512	64	>512	>256	>256	>256	512	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ114	0	0	>2048	>256	>2048	>256	>512	64	>512	>256	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ120	1	1	>2048	>256	>2048	>256	>512	128	>512	256	>256	256	256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ123	1	1	2048	>256	2048	>256	>512	32	>512	256	>256	>256	128	>256	>256	64	128	>256
PAJ127	1	1	>2048	>256	>2048	16	>512	64	>512	>256	>256	128	256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ128	1	0	>2048	>256	>2048	>256	>512	128	>512	>256	>256	256	256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ133	1	1	2048	>256	>2048	>256	>512	64	>512	256	>256	>256	512	4	>256	>256	>256	32
PAJ145	1	1	512	>256	2048	>256	>512	32	>512	256	>256	>256	64	>256	>256	64	128	>256
PAJ146	1	1	512	64	512	16	>512	16	>512	256	>256	64	64	256	>256	128	>256	32
PAJ147	1	0	1024	>256	>2048	>256	>512	64	>512	>256	>256	128	128	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ148	1	0	2048	>256	2048	>256	>512	32	>512	256	>256	>256	128	>256	>256	64	128	>256
PAJ151	1	1	1024	32	2048	4	>512	64	>512	>256	>256	128	512	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ163	1	1	R	R	>2048	R	>512	128	>512	R	>256	256	>512	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ166	1	1	R	R	>2048	S	>512	64	>512	R	>256	>256	256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ172	1	1	R	R	>2048	R	>512	128	>512	R	>256	256	256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ173	1	1	R	R	>2048	R	>512	128	>512	R	>256	>256	>512	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ175	1	1	R	R	>2048	R	>512	128	>512	R	>256	128	128	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ176	1	1	R	R	>2048	R	>512	128	>512	R	>256	256	128	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ189	0	0	R	R	1024	R	>512	0.5	>512	R	>256	256	16	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ191	1	1	R	R	>2048	R	>512	16	>512	R	>256	>256	256	>256	>256	>256	256	>256
PAJ197	0	1	R	R	>2048	S	>512	64	>512	R	>256	256	256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ203	0	1	R	R	256	R	128	64	>512	R	>256	>256	64	>256	256	256	>256	>256
PAJ204	1	1	R	R	128	S	256	1	>512	R	>256	>256	16	>256	>256	128	>256	>256
PAJ207	0	1	R	R	128	S	>512	64	>512	R	>256	>256	8	>256	>256	128	>256	>256
PAJ208	0	1	32	R	128	S	>512	1	>512	8	256	128	8	>256	>256	>256	128	8
PAJ212	0	0	512	R	2048	R	512	32	>512	256	>256	>256	64	>256	>256	128	>256	>256
PAJ213	0	0	R	R	>2048	S	>512	128	>512	R	>256	256	256	>256	>256	>256	>256	>256
PAJ214	0	0	R	R	>2048	R	128	32	>512	R	>256	>256	128	>256	>256	128	>256	>256
PAJ215	0	0	R	R	>2048	S	128	32	>512	R	>25	>256	128	64	>256	64	>256	>256

1, expression; 0, no expression

ดื้อยา kanamycin, neomycin, streptomycin, spectinomycin, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol และ trimethoprim ในระดับสูง ($MIC \geq 128 \mu\text{g/ml}$) เชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อ carbenicillin, piperacillin, aztreonam, amikacin และ tobramycin ในระดับสูง ค่า MICs ของยา gentamycin, ciprofloxacin และ imipenem มีความหลากหลายอยู่ในช่วง $1 \rightarrow 256 \mu\text{g/ml}$, $0.5-64 \mu\text{g/ml}$ และ $4-128 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ การที่เชื้อดื้อต่อยาหลายชนิดและต่างกลุ่มแสดงถึงการแสดงออกของกลไกการดื้อยาแบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ (nonenzymatic resistance mechanisms) อย่างน้อย 1 กลไกในเชื้อที่ทดสอบและบ่งชี้ถึงการแสดงของระบบ multidrug efflux pump

การแสดงออกของยีน *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexK*, *mexW*, *mexY* และ *oprD*

ระดับการแสดงออกของยีน RND transporter ที่จำเพาะของแต่ละระบบแสดงในตารางที่ 11 เชื้อจำนวน 4 isolates ได้แก่ PAJ107, PAJ197, PAJ207 และ PAJ208 ผลิต MexB มากกว่า PAO1 3.1-6.2 เท่า เชื้อจำนวน 8 isolates ผลิต MexF และเชื้อจำนวน 10 isolates ผลิต MexW ในระดับที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ PAO1 (4.3-462.2 เท่า) เชื้อทุกตัวผลิต MexY (3.9-1,180 เท่า) แต่ไม่มีเชื้อตัวใดเลยที่ผลิต MexD

การกลายพันธุ์ในยีนควบคุม (regulatory genes)

พบการกลายพันธุ์ที่หลากหลายในยีน *mexR*, *mexZ* และ *mexL* (ตารางที่ 11) ซึ่งเป็นยีนควบคุมลบของระบบ MexAB-OprM, MexXY และ MexJK แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *ngxB* ซึ่งเป็นยีนควบคุมลบของระบบ MexCD-OprJ เชื้อจำนวน 2 isolates (i.e. PAJ208 และ PAJ214) ที่มีการกลายพันธุ์ใน *mexR* และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนคือ Val(GTG)-126-Glu(GAG) และ Thr(ACC)-130-Ser(TCC) เชื้อทั้งหมดไม่มี 8-bp insertion ในยีน *mexT* ซึ่งเป็นยีนควบคุมบวกของระบบ MexEF-OprN ที่พบได้ใน PAO1 โดยเชื้อ 2 isolates (i.e. PAJ107 และ PAJ214) มีการกลายพันธุ์ Leu(TTG)-115-Met (ATG) เชื้อจำนวน 2 isolates (i.e. PAJ208 และ PAJ214) ที่มีการกลายพันธุ์ใน *mexL* โดย PAJ214 มีการกลายพันธุ์มากถึง 3 แบบ (Ser(TCC)-4-Pro(CCC), Ser(TCC)-6-Phe(TTC), His(CAC)-163-Arg(CGC)) ส่วนในยีน *mexZ* เชื้อส่วนใหญ่มี 72-bp deletion จาก nucleotide ที่ 250 ถึง 321 เชื้อ PAJ214 มีการกลายพันธุ์เพิ่มเติมคือ Ala(GCC)-175-Val(GTC) และไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน *mexZ* ของ PAJ191 ได้

ตารางที่ 10. Antimicrobial susceptibilities of the *P. aeruginosa* clinical isolates (n=13)

Strain	MIC (µg/ml)																
	Car	Pip	Cef	Atm	Amk	Gen	Kan	Neo	Str	Spc	Cip	Tet	Ery	Chp	Tri	Tob	Imp
PAO1	128	8	4	1	8	1.6	128	32	32	256	0.5	32	512	32	256	4	1
PAJ107	>2048	256	4	64	>2048	>256	>256	128	>256	>256	64	>256	>512	>512	256	>256	128
PAJ111	2048	512	8	32	2048	>256	>256	>256	>256	>256	64	>256	>512	>512	>256	>256	128
PAJ127	>2048	256	16	>256	>2048	>256	>256	128	>256	>256	64	>256	>512	>512	>256	>256	32
PAJ147	>2048	128	>256	>256	1024	>256	>256	128	>256	>256	64	>256	>512	>512	>256	>256	64
PAJ151	2048	512	4	32	1024	>256	>256	128	>256	>256	64	>256	>512	>512	>256	>256	16
PAJ166	>2048	256	256	>256	512	256	>256	>256	>256	>256	64	>256	>512	>512	>256	>256	16
PAJ172	>2048	256	>256	>256	256	256	>256	256	>256	>256	128	>256	>512	>512	>256	>256	4
PAJ189	1028	16	64	>256	32	16	>256	256	>256	>256	0.5	>256	>512	>512	>256	>256	16
PAJ191	>2048	256	>256	>256	32	64	>256	>256	>256	>256	16	>256	>512	>512	256	>256	>128
PAJ197	>2048	256	>256	>256	512	>256	>256	256	>256	>256	64	>256	>512	>512	>256	>256	64
PAJ207	128	8	16	16	512	16	>256	>256	>256	>256	64	128	>512	>512	>256	>256	128
PAJ208	128	8	16	>256	32	>256	256	128	>256	>256	1	>256	>512	>512	128	8	128
PAJ214	>2048	128	32	>256	32	>256	>256	>256	>256	>256	32	128	>512	128	>256	>256	16
Breakpoint	512	128	32	32	64	16	16	16	32	32	4	16	8	32	4	16	16

Amk, amikacin; Atm, aztreonam; Car, carbenicillin; Cef, ceftaxidime; Chp, chloramphenicol; Cip, ciprofloxacin; Ery, erythromycin; Gen, gentamicin; Imp, imipenem; Kan, kanamycin; Neo, neomycin; Pip, piperacillin; Spc, spectomycin; Str, streptomycin; Tet, tetracycline; and Tri trimethoprim

ตารางที่ 11 Expression of the Mex systems and mutations in the corresponding regulatory regions in *P. aeruginosa* isolates ($n=13$)

Strain	Transcription level							Regulatory mutation ^a				
	MexB	MexD	MexF	MexK	MexW	MexY	OprD	<i>mexR</i>	<i>nfxB</i>	<i>mexT</i> ^b	<i>mexL</i>	<i>mexZ</i> ^d
PAO1	1	1	1	1	1	1	1			(+)		
PAO200-2	ND	83.8	ND	ND	ND	ND	ND	-				
PAO7H	ND	ND	35.9	ND	ND	ND	2.2	-		(-)		
PAO238-1	ND	ND	ND	4.2	ND	ND	ND	-				
PAO267	ND	ND	ND	ND	ND	66.2	ND	-				
PAJ107	6.2	1.4	0.9	0.28	198.5	1,180.3	29.9	-	-	(-) ^c , Leu(TTG)115Met (ATG)	-	Δ72bp
PAJ111	0.7	0.03	1.5	0.84	242.2	76.7	245	-	-	(-) ^c	-	-
PAJ127	1.5	0.01	3.56	0.09	462.2	128	4.5	-	-	(-) ^c	-	Δ72bp
PAJ147	0.3	0.3	2.5	0.08	191.83	30.6	6.3	-	-	(-) ^c	-	Δ72bp
PAJ151	2.5	0.1	8.6	0.18	583.6	593.1	29.6	-	-	(-) ^c	-	Δ72bp
PAJ166	1.2	0.2	10.4	4.1	85.73	36.9	28.4	-	-	(-) ^c	-	Δ72bp
PAJ172	1.4	0.2	5.2	0.09	1.6	49.3	4.3	-	-	(-) ^c	-	Δ72bp
PAJ189	0.4	0.1	2.5	0.67	7.5	4.0	7.6	-	-	(-) ^c	-	-
PAJ191	1.9	0.3	11.9	0.82	37.4	18,880	3	-	-	(-) ^c	-	NA
PAJ197	3.1	0.1	9.9	1.11	1.72	208.1	1.4	-	-	(-) ^c	-	Δ72bp
PAJ207	4.1	0.5	26.2	1.41	2.15	3.9	1.8	-	-	(-) ^b	-	Δ72bp
PAJ208	4.4	0.8	11.8	1.25	4.3	37	6.4	Val(GTG)-126-Glu(GAG)	-	(-) ^c	Ser(TCC)-4-Pro(CCC)	-
PAJ214	1.8	1.1	2.7	1.69	32.6	123.5	6.7	Thr(ACC)-130-Ser(TCC)	-	(-) ^c , Leu(TTG)-115-Met (ATG)	Ser(TCC)-4-Pro(CCC), Ser(TCC)-6-Phe(TTC), His(CAC)-163-Arg(CGC)	Ala(GCC)-175-Val(GTC)

NA No amplifications

ND not determined

^a - Identical to the PAO1 sequence from nucleotide position 104

^b (+), with or (-), without insertion of 8 nucleotides (cggccagc) downstream

^c with additional mutation Phe(TTC)-129-Ile(ATC)

^d Δ72bp deletion of 72 nucleotides from nucleotide positions 250 to 321

ตารางที่ 12 ยีนควบคุม AMG-modifying enzymes ในเชื้อที่ทดสอบ (n=13)

Strain	Class 1 integrons	AMG-modifying enzymes
PAJ107	<i>blaOXA10-aac(3')Ia</i>	<i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, aadA2, strA-strB</i>
PAJ111	<i>aadB-cmlA-aadA1</i>	<i>aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, aadA2, strA-strB</i>
PAJ127	<i>blaOXA10-aac(3')Ia</i>	<i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, aadA2, strA-strB</i>
PAJ147	<i>aadB-cmlA-aadA1</i>	<i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, aadA2</i>
PAJ151	<i>blaOXA10-aac(3')Ia</i>	<i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, aadA2, strA-strB</i>
PAJ166	<i>blaOXA10-aac(3')Ia</i>	<i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, strA-strB</i>
PAJ172	<i>aadB-cmlA-aadA1</i>	<i>aac(3')-Ia, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, strA-strB</i>
PAJ189	<i>blaIMP15-dhfr-aac(6')</i>	<i>aac(6')-IIa, aph(3')-IIb, aadB, aadA1, aadA2</i>
PAJ191	-	<i>aph(3')-IIb, aadB, aadA1, strA-strB</i>
PAJ197	<i>aadB-cmlA-aadA1</i>	<i>aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1, aadA2, strA-strB</i>
PAJ207	<i>aadB-cmlA-aadA1</i>	<i>aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB, aadA1</i>
PAJ208	-	<i>aph(3')-IIb, aadB, aadA1, strA-strB</i>
PAJ214	<i>aacA4,</i>	<i>aac(6')-IIa, aph(3')-IIb, ant(2'')-Ia, aadB</i>

6. ผลของ EPI ต่อการต้านยา carbenicillin ในเชื้อที่มีการแสดงออกของระบบ MexAB-OprM

เมื่อใช้ efflux pump inhibitor ชนิด PA β N พบว่าค่า MIC ของยา carbenicillin มีค่าลดลงตั้งแต่ 1-128 เท่า ดังนี้

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงค่า MIC ของยา carbenicillin ในสภาวะที่มีหรือไม่มี PA β N

Strain	Mex expression	Carbencilicnn MIC		Fold reduction
		Without EPI	With EPI	
PAO1	MexAB-OprM	512	64	3
PAO200	PAO1 Δ ABM	128	128	-
PAJ114	MexAB-OprM, MexXY	16384	8192	-
PAJ189	MexAB-OprM, MexXY	8192	512	16
PAJ212	MexAB-OprM, MexXY	8192	1024	8
PAJ213	MexAB-OprM, MexXY	16384	16384	-
PAJ214	MexAB-OprM, MexXY	8192	8192	-
PAJ215	MexAB-OprM, MexXY	8192	4096	2

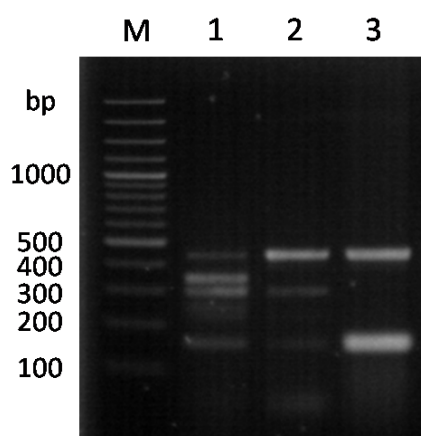
7. การตรวจการดื้อยาที่เกิดจากการแสดงออกของระบบ multidrug efflux systems ด้วย multiplex RT-PCR

เชื้อที่ทราบ genotype จำนวน 5 isolates ที่ใช้เป็นตัวควบคุมในการทดสอบ ดังนี้

Strain	Mex expression
PAO1	ABM,XY
PAO200	PAO1 Δ ABM
PAO200-2	PAO200C ⁺ D ⁺ J ⁺
PAO7H1A	Δ ABM E ⁺ F ⁺ N ⁺
PAO255	PAO7H1A Δ EFN
PAO267	Δ ABMX ⁺ Y ⁺
PAO280	Δ ABM Δ XY

เชื้อจำนวน 13 isolates ที่ทำการทดสอบได้แก่ PAJ107, PAJ147, PAJ151, PAJ189, PAJ191 จาก PAJ208, PAJ111, PAJ127, PAJ197, PAJ20, PAJ166, PAJ172 และ PAJ214 เชื้อเหล่านี้ได้รับการทดสอบการแสดงออกของระบบทั้ง 4 แล้วด้วยเทคนิค RT-PCR และค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะต่างๆ แล้ว

เมื่อทดสอบการแสดงออกของระบบในเชื้ออ้างอิงทั้ง 7 isolates พบว่า สามารถทำการทดสอบได้ 4 ระบบพร้อมกัน เมื่อนำไปทดสอบกับ clinical isolates ก็สามารถตรวจการแสดงออกของระบบได้เช่นกัน (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 PCR patternsที่ได้จากการตรวจการแสดงออกของระบบ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY ด้วย Multiplex RT-PCR M; marker, lane 1; ส่วนผสมของ mRNA เชื้ออ้างอิง คือ *mexB* (150 bp), *mexC* (250 bp), *mexD* (350 bp) และ *mexZ* (450 bp) lane 2 and 3; *mexB* (150 bp) และ *mexY* (450 bp), lane 1 and 2 พบ non-specific band ขนาด 300 bp

ตารางที่ 14 ผลการตรวจการแสดงออกของ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY ด้วย multiplex RT-PCR

Strain	Relevant genotype	RT-PCR				Multiplex RT-PCR			
		<i>mexB</i>	<i>mexD</i>	<i>mexF</i>	<i>mexY</i>	<i>mexB</i>	<i>mexD</i>	<i>mexF</i>	<i>mexY</i>
PAO1	MexA ⁺ B ⁺ -OprM ⁺ , MexX ⁺ Y ⁺	+	-	-	+	+	-	-	+
PAO200	PAO1Δ(<i>mexAB-oprM</i>)	-	-	-	+	-	-	-	+
PAO200-2	PAO200MexC ⁺ D ⁺ -OprJ ⁺	-	+	-	+	-	+	-	+
PAO7H1A	Δ(<i>mexAB-oprM</i>) E ⁺ F ⁺ N ⁺	-	-	+	+	-	-	+	+
PAO255	PAO7H1AΔ(<i>mexEF-oprN</i>)	-	-	-	+	-	-	-	+
PAO267	Δ(<i>mexAB-oprM</i>)MexX ⁺ Y ⁺	-	-	-	+	-	-	-	+
PAO280	Δ(<i>mexAB-oprM</i>)Δ(<i>mexXY</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
PAJ107	Clinical isolates	+	+	+	+	+	-	-	-
PAJ111	Clinical isolates	+	+	+	+	-	-	-	-
PAJ127	Clinical isolates	+	+	+	+	+	-	+	-
PAJ147	Clinical isolates	+	+	-	+	-	-	-	+
PAJ151	Clinical isolates	+	+	+	+	+	-	-	-
PAJ166	Clinical isolates	+	+	+	+	+	-	+	-
PAJ172	Clinical isolates	+	+	+	+	+	-	-	+
PAJ189	Clinical isolates	+	-	-	+	-	-	-	-
PAJ191	Clinical isolates	+	+	+	+	+	+	+	+
PAJ197	Clinical isolates	+	-	+	+	+	-	-	+
PAJ207	Clinical isolates	+	-	+	+	+	-	-	-
PAJ208	Clinical isolates	+	-	+	+	+	-	-	-
PAJ214	Clinical isolates	+	-	-	+	+	-	-	+
PAJ114	Clinical isolates	+	-	-	-	+	-	+	+
PAJ128	Clinical isolates	+	+	-	+	-	-	-	-
PAJ212	Clinical isolates	+	-	-	+	-	-	-	-
PAJ215	Clinical isolates	+	-	-	+	-	-	-	-

การอภิปรายผลการวิจัย

1. ระบบ *mexXY* และกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัขและแมว

จากการศึกษา *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสุนัขและแมวพบว่าดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides หลายชนิดพร้อมกัน โดยพบการดื้อยา spectinomycin streptomycin kanamycin และ neomycin ในอัตราที่สูงสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [28] ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะเหล่านี้อย่างกว้างขวางในการรักษาสุนัขและแมวเนื่องจากมีราคาค่อนข้างต่ำ ในทางตรงกันข้ามไม่พบเชื้อดื้อยา amikacin และพบอัตราการดื้อยา gentamicin และ tobramycin ที่ต่ำ ซึ่งทั้ง gentamicin และ amikacin เป็นยาทางเลือกสุดท้ายในการรักษาอาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* เพราะมีฤทธิ์ข้างเคียงต่อไตและการได้ยิน ส่วน tobramycin มีฤทธิ์ข้างเคียงเช่นกันและไม่ใช้ในการรักษาต่อเนื่องระยะยาว การที่ยาเหล่านี้ถูกใช้อย่างค่อนข้างจำกัดทำให้เชื้อมีอัตราการดื้อที่ยังต่ำอยู่

ระบบ MexXY มีบทบาทต่อการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ของ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสุนัขและแมวพบว่าหลากหลายสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสัตว์ชนิดอื่น [23] โดยรวมการสูญเสีย *mexXY* ทำให้ค่า MIC ของ aminoglycosides หลายชนิดลดลง 4-16 เท่าในเชื้อหลาย isolates แสดงถึงบทบาทสำคัญของระบบ MexXY ต่อการดื้อ aminoglycosides หลายชนิดพร้อมกันในเชื้อเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม การที่ $\Delta(mexXY)$ มีผลต่อการดื้อ aminoglycosides ในระดับปานกลาง (moderate effects) ในเชื้อหลาย isolates แสดงว่ายังมีกลไกการดื้อ aminoglycosides อื่นๆที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาอยู่ในเชื้อนี้ ซึ่งก่อนหน้านี้ได้เคยมีรายงานถึงผลกระทบเพียงเล็กน้อยของ $\Delta(mexXY)$ ต่อการดื้อ aminoglycosides ที่สำคัญในการรักษาการติดเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ [23] ผลกระทบเหล่านี้มีความสำคัญโดยทำให้ความเข้มข้นของ aminoglycosides ไม่ถึง optimal concentration โดยเฉพาะในกรณี que การเข้าสู่เซลล์ของ aminoglycosides ถูกขัดขวาง

ผลของ $\Delta(mexXY)$ ต่อ aminoglycosides แต่ละชนิดในเชื้อแต่ละ isolate แตกต่างกัน ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการประสมประสานรวมกันของกลไกการดื้อ aminoglycosides อื่นๆที่มีการแสดงออกและเป็นส่วนเพิ่มเติมจากระบบ MexXY ในแต่ละเชื้อ

นอกจากนี้ เชื้อส่วนใหญ่มี aminoglycoside-modifying enzyme encoding genes ซึ่งยืนยันถึงการปรากฏของกลไกการดื้อ aminoglycosides อื่นๆใน *P. aeruginosa* อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดว่ายีนเหล่านี้มีส่วนร่วมต่อการดื้อ aminoglycosides ในระดับไหนซึ่งต้องมีศึกษาบทบาทและการมีส่วนร่วมของ aminoglycoside-modifying enzyme encoding genes ต่อไป

ระดับการแสดงออกของ *mexXY* และความสัมพันธ์ต่อการดื้อ aminoglycosides มีความหลากหลาย โดยเชื้อที่ระดับการแสดงออกของ *mexXY* สูงสุดคือ PAJ227 ไม่ได้ดื้อต่อ

aminoglycosides มากกว่าเชื้อที่มีระดับการแสดงออกของ *mexXY* ต่ำกว่า เช่น PAJ234 PAJ240 PAJ228 และ PAJ235 ซึ่งเชื้อที่มีระดับการแสดงออกของ *mexXY* ต่ำสามารถดื้อต่อ aminoglycosides ได้ถึง 4 ชนิด เมื่อพิจารณาร่วมกัน ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนว่า ระดับการแสดงออกของ *mexXY* ไม่มีความสัมพันธ์กับการดื้อ aminoglycosides ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในเชื้อที่แยกได้จากสัตว์และคน [23, 29] ดังนั้นการที่เชื้อมีระดับการแสดงออกของ *mexXY* ในระดับสูงไม่สามารถใช้เป็น absolute marker สำหรับการดื้อยา aminoglycosides ในระดับสูงของ *P. aeruginosa* ได้

การกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดภายใน MexZ คือ A(-112)G อยู่นอก MexZ-binding domain แต่ยังคงอยู่ใน the predicted promoter ของ *mexX* ที่อยู่ระหว่าง nucleotides ที่ -88 และ -133 จาก transcription site ของ *mexX* [23] ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการปรากฏและจำนวนของการกลายพันธุ์แบบ single base pair changes ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของ *mexXY* และการที่ไม่มีการกลายพันธุ์ใน *mexZ-mexX* intergenic region ไม่สามารถรับรองว่า *mexXY* จะมีการแสดงออกในระดับต่ำเสมอไป ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ใน *mexZ-mexX* intergenic region ไม่น่าจะมีส่วนสำคัญต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน MexZ และการทำงานเป็น repressor ของระบบ *mexXY*

P. aeruginosa ที่มีการระดับการแสดงออกของ *mexXY* ใกล้เคียงกันมีระดับการแสดงออกของ PA5471 ที่แตกต่างกัน 2-13 เท่า ในขณะที่เชื้อที่มีระดับการแสดงออกของ PA5471 ใกล้เคียงกันมีระดับการแสดงออกของ *mexXY* ที่แตกต่างกันมาก แสดงว่า ระดับการแสดงออกของ PA5471 และ *mexXY* ไม่มีความสัมพันธ์กัน เชื้อจำนวน 2 isolates คือ PAJ233 และ PAJ232 มีระดับการแสดงออกของ PA5471 สูงถึง 86 และ 28 เท่าตามลำดับ แต่กลับไม่ผลิต MexXY ในระดับสูงซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เป็น Cystic Fibrosis (CF) [30] ในทางกลับกัน เชื้อจำนวน 3 isolates คือ PAJ229 PAJ240 และ PAJ238 ที่มีระดับการแสดงออกของ PA5471 ใกล้เคียงกับ PAO1 มีการแสดงออกของ MexXY ในระดับ 3-21 เท่า แสดงว่ายังมีกลไกอื่นๆ ที่ควบคุมการแสดงออกของ *mexXY* ในเชื้อเหล่านี้ เชื้อที่การแสดงออกของ PA5471 ในระดับสูงไม่ได้ผลิต *mexXY* ในระดับสูงกว่าและไม่ดื้อต่อ aminoglycosides มากกว่าเชื้อที่การแสดงออกของ PA5471 ในระดับต่ำ ตัวอย่างเช่น PAJ233 ไม่ดื้อต่อ aminoglycosides มากกว่า PAJ288 และ PAJ235 ดังนั้น การมีการแสดงออกของ PA5471 ในระดับสูงไม่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สมบูรณ์แบบ (conclusive indicator) ของการผลิต MexXY และการดื้อ aminoglycosides ในระดับสูง

จากการถอดรหัสพันธุกรรมพบว่ามีเพียงแค่การกลายพันธุ์แบบ single base pair change คือ G-367-T ในยีน *rplY* ของเชื้อจำนวน 2 isolates เท่านั้น การกลายพันธุ์นี้อาจมีผลต่อการดื้อ aminoglycosides แต่อยู่ในระดับใดไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

เนื่องจากยีน *nuoH* อยู่ที่ downstream ของยีน *nuoG* ดังนั้นจึงตรวจการแสดงออกของยีน *nuoH* เพื่อทดสอบว่า ยีน *nuoG* มีการแสดงออกที่สมบูรณ์หรือไม่ จากการศึกษาพบว่าเชื้อทุกตัวมีการแสดงออกของยีน *nuoH* แสดงว่ายีน *nuoG* มีการแสดงออกและชี้ให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ในยีน *nuoG*

ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อ aminoglycosides ในเชื้อที่ทดสอบในครั้งนี้อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้นำให้เห็นว่า *nuoG* *rplY* และ *galU* ไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อระดับการดื้อ aminoglycosides ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากสุนัขและแมว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย[30]

การอภิปรายผลในส่วนระบบ *mexXY* และกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย การปรากฏของ aminoglycoside-modifying enzyme encoding genes ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัข แมวและผู้ป่วย การแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ MexEF-OprN และ MexXY ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัข แมวและผู้ป่วยจะทำเมื่อได้ผลการวิจัยครบถ้วน

2. ระบบ *mexXY* และกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม aminoglycosides ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย

เชื้อที่ได้จากผู้ป่วยในการศึกษานี้ดื้อต่อ AMGs หลายชนิดพร้อมกันในระดับสูง โดยรวมอัตราการดื้อต่อ AMGs สูงกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ [31-33] ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่เชื้อสัมผัสยาในกลุ่มนี้จาก empirical treatment ที่ใช้ยาที่เป็นประกอบด้วย β -lactams และ AMGs คือ ceftaxidime/gentamicin and/or imipenem/amikacin

เชื้อส่วนใหญ่มี resistance phenotype ที่สอดคล้องกับยีน AMG-modifying enzymes ที่ตรวจพบแสดงว่า ยีนเหล่านี้มีการแสดงออกเป็นปกติเมื่อมีการปรากฏที่น่าสนใจคือ เชื้อ PA190 (gentamicin MIC=4 μ g/ml) มียีนควบคุมการดื้อ gentamicin ถึง 3 ยีนแต่ยังคงไวต่อยา gentamicin ซึ่งยังไม่ทราบเหตุผลที่แท้จริง ลักษณะเช่นนี้เคยมีรายงานมาก่อนในเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ที่ไวต่อ oxacillin และ/หรือ gentamicin [34] และ *S. aureus* ที่ไวต่อ oxacillin และ/หรือ erythromycin [35] ซึ่งได้แนะนำว่า อาจเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน การขาด host factor ที่จำเป็นต่อการแสดงออกของยีนหรือค่า MIC ที่ใกล้กับค่า breakpoint [35]a, 2000b) ในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อ *P. aeruginosa* มียีนควบคุมการดื้อยา AMGs หลายยีน ซึ่งแตกต่างจากการรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า เชื้อส่วนใหญ่มียีนควบคุมการดื้อยา AMGs เพียงยีนเดียว [36] อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยนี้สามารถอธิบายการดื้อยา AMGs หลายชนิดพร้อมกันของเชื้อเหล่านี้ได้ ยีนที่พบมากที่สุดคือ *aadA1* (84%) และ *aadB* (84%) ยีนทั้ง 2 พบได้บ่อยในแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Salmonella enteric* และ *Escherichia coli* [22, 37] แสดงให้เห็นว่ามีการหมุนเวียนของยีนทั้ง 2 ภายในแบคทีเรียต่างชนิดกัน การพบยีนชนิดเดียวกันในเชื้อต่างกันที่มีแหล่งที่มาต่างกันบ่งชี้ว่ายีนเหล่านี้อยู่บนชิ้นส่วนพันธุกรรมที่ถ่ายทอดได้ เช่น plasmid, transposon อย่างไรก็ตาม ไม่ได้ทำการศึกษากายทอดแบบขวางในครั้งนี้อย่างไรก็ตาม

ยีน *ant(2'')-I* และ *aac(6')-II* เป็นยีนควบคุมการดื้อยา AMGs ที่มักพบได้มากที่สุด ใน *P. aeruginosa* [33, 38] ในการศึกษาครั้งนี้ พบยีน *ant(2'')-Ia* ในอัตราที่สูง (72%) ซึ่งสูงกว่ารายงานในประเทศสหรัฐอเมริกาและยุโรป [36] จากยีน *aac(6')-II* ทั้ง 2 ชนิดที่ทดสอบ ตรวจพบแต่ยีน *aac(6')-IIa* (27%) เท่านั้น เหตุผลที่แท้จริงยังไม่ชัดเจนและอาจเกี่ยวข้องกับชนิดของ AMGs ที่ใช้ภายในประเทศก็ได้

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างยีนบางคู่ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า ยีนเหล่านี้อาจอยู่บน genetic elements เดียวกัน (co-localization) หรือมีการแพร่กระจายของเชื้อตัวเดียวกัน อย่างไรก็ตามไม่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relatedness) และพลาสมิดในการศึกษาครั้งนี้ พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างยีน *ant(2'')-I* และการดื้อต่อยา gentamicin ซึ่งยืนยันความเด่นของยีนนี้ใน *P. aeruginosa* ที่เป็น clinical isolates ในทางตรงกันข้าม ยีน *aac(6')-IIa* ความสัมพันธ์ในเชิงลบกับยีน *aadB* ซึ่งอาจเนื่องมาจากการไม่สามารถอยู่ร่วมกันได้บน plasmid ที่อยู่ใน incompatibility groups เดียวกัน

ได้มีการศึกษาผลของ MexXY ต่อการดื้อ AMGs ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้จากคนและสัตว์ [23, 29, 39] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อส่วนใหญ่ ($n=29$) มีการแสดงออกของระบบ MexXY อย่างไรก็ตาม ไม่ได้ทำการศึกษาส่วนร่วมที่แท้จริงของกลไกนี้ต่อการดื้อ AMGs พบเชื้อ 1 isolate ที่ไม่มีการแสดงออกของ MexXY (Gr. IV) แต่ดื้อต่อ AMGs ทุกชนิดที่ทดสอบแสดงว่า ระบบ MexXY ไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยา AMGs ในเชื้อชนิดนี้ สนับสนุนว่าระบบ MexXY ไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยา AMGs เสมอไปและส่วนร่วมของระบบนี้ก็มีหลากหลาย เชื่อที่ไม่มีการแสดงออกของระบบ MexXY มีการกลายพันธุ์แบบ Ala123-Ser ในโปรตีน Rpyl และยีน *aph(3')-IIb*, *aadA2* และ *strA-strB* อย่างไรก็ตาม ยีนเหล่านี้ไม่สามารถอธิบายภาพรวมของการดื้อ AMGs ในเชื้อเหล่านี้ได้และอาจมีกลไกอื่นๆที่ควบคุมการดื้อยา AMGs ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา

จากการศึกษายีน *nuoG* อยู่ใน *nuoABCDEFGHJKLMN* operon ด้วยการทดสอบ *nuoH* transcription พบว่า มีเชื้อ 2 isolates ที่ไม่มีการสร้าง mRNA ของยีน *nuoH* (Gr. III and IV) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบเชื้อเพียง 1 isolate ที่มี disrupted *nuoG* [30] ในขณะที่ protonmotive force ของเชื้อทั้ง 2 อาจได้รับความเสียหาย มีเชื้อเพียง 1 isolate เท่านั้นที่มีการแสดงออกของระบบ MexXY แสดงว่า MexXY ในเชื้อตัวนี้ทำงานได้ไม่สมบูรณ์

เชื้อจำนวน 6 isolates (Gr. II and IV) มีการกลายพันธุ์แบบ Ala123-Ser ในโปรตีน Rpyl ซึ่งไม่เคยมีรายงานใน *P. aeruginosa* มาก่อน ซึ่งขัดแย้งกับรายงานก่อนหน้านี้ในเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย Cystic Fibrosis ที่ไม่พบมีการกลายพันธุ์ในยีน *rpLY* เลย [30] ความแตกต่างนี้น่าจะเป็นผลมาจากความแตกต่างทางสายพันธุ์และความแตกต่างของยา AMGs ที่ใช้

การศึกษานี้ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *galU* ในเชื้อตัวใดเลยสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ [30] เมื่อพิจารณาร่วมกันแสดงให้เห็นว่ายีน *galU* ไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อ AMGs ใน *P. aeruginosa* ทั้งที่แยกได้จากผู้ป่วย Cystic Fibrosis และผู้ป่วยโรคอื่นๆ

3. การแสดงออกของระบบ MEX ในเชื้อที่แยกได้จากสุนัข แมวและผู้ป่วย

เชื้อจำนวน 13 isolates ที่ใช้ในการศึกษา คัดเลือกจากที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายชนิดพร้อมกันในระดับสูง โดยแยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลศรราช ในช่วงปี พ.ศ. 2006-2008 เชื้อแต่ละตัวแยกจากคนไข้ต่างรายและได้รับการยืนยันว่าทางพันธุกรรมว่าไม่ใช่ clone ตัวเดียวกันด้วย ERIC PCR โดยสิ่งสำคัญของผลการวิจัยก็คือ การที่เชื้อสามารถมีการแสดงออกของระบบ MEX หลายระบบพร้อมกัน โดยมากถึง 4 ระบบ (PAJ166 และ PAJ208) ที่รวมถึงการแสดงออกของระบบที่ปกติแล้วจะไม่มีการแสดงออกใน wildtype ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการแสดงออกของระบบ Mex 2 ระบบในเชื้อที่แยกได้ทางคลินิก คือ ระบบ MexAB-OprM/MexXY [40] และระบบ MexAB-OprM/MexEF-OprN [41]

ระบบ MexAB-OprM โดยปกติแล้วมีการแสดงออกในระดับต่ำอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา (low constitutive expression level) พบว่าเชื้อจำนวน 4 isolates (PAJ107, PAJ197, PAJ207 และ PAJ208) มีการแสดงออกของ MexB สูงกว่า PAO1 (2.5-6.2 fold) เชื้อ PAJ207 และ PAJ208 มีการแสดงออกของ MexB สูงกว่า PAO1 4.1 และ 4.4 fold ตามลำดับ แต่เป็นเชื้อที่ไวต่อ carbencillin, piperacillin, และ ceftaxidime โดยค่า MIC ต่ำกว่าเชื้อที่มีการแสดงออกของ MexB ต่ำกว่า เช่น PAJ166, PAJ191, PAJ197 แสดงว่ายังมีกลไกอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม β -lactams เหล่านี้ในเชื้อทั้ง 2 โดยเชื้อที่มีการแสดงออกของ MexB ต่ำกว่าหรือไม่แตกต่างจาก PAO1 มีค่า MICs ของยาในกลุ่ม β -lactams สูงกว่า PAO1 มาก อธิบายได้ด้วย ความแตกต่างทางพันธุกรรม resistance dynamics และ/หรือการสัมผัส selective pressure ของเชื้อในห้องปฏิบัติการและเชื้อที่แยกได้ทางคลินิก

เชื้อทุกตัวมีการแสดงออกของระบบ MexXY ซึ่งรับผิดชอบ intrinsic resistance ของเชื้อและเป็นการแสดงออกในระดับที่สูงด้วย โดยมีเชื้อ 2 isolates ที่มีระดับออกมากกว่า 100 เท่าของ PAO1 (PAJ107, 1180.0 fold และ PAJ191, 5,880 fold) อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 isolates มีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม AMGs ไม่แตกต่างไปจากเชื้ออื่นๆที่ทดสอบและมีการแสดงออกของระบบ MexXY ในระดับที่ต่ำกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่ว่า ระดับการแสดงออกของระบบ MexXY ไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติกับระดับความดื้อต่อยา AMGs ของเชื้อและยังมียีนอื่นๆที่มีส่วนร่วมต่อการดื้อยาในกลุ่ม AMGs ของเชื้อเหล่านี้ (ตารางที่ 12) เชื้อบางตัว (PAJ111, PAJ127, PAJ147, PAJ166, PAJ172, PAJ189, PAJ191 และ PAJ214) มีระดับการแสดงออกของ MexB ไม่แตกต่างจาก PAO1 โดยเฉพาะ PAJ191 ที่มีการแสดงออกของ MexY มาถึง 5,880 fold แต่มีการแสดงออกของ MexB เทียบเท่ากับ PAO1 ดังนั้นระดับการแสดงออกของระบบ MexXY ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของระบบ MexAB-OprM ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [42]

ในการศึกษารุ่นนี้ ไม่พบเชื้อตัวใดที่มีการแสดงออกของ MexCD-OprJ โดยส่วนใหญ่มีระดับการแสดงออกของ MexD ต่ำกว่า PAO1 เป็นการยืนยันว่า ระบบนี้มีลักษณะเป็น normally silent และไม่มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาของเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ในเชื้อที่

แยกได้จากผู้ป่วย Cystic fibrosis จำนวน 85 isolates และพบว่ามีการแสดงออกของระบบนี้เพียง 2 isolates [43] ในทำนองเดียวกัน มีเชื้อเพียง 1 isolates เท่านั้นที่มีการแสดงออกของ MexJK สูงกว่า PAO1 (4.1 fold) ซึ่งระบบนี้สามารถปั๊มยาปฏิชีวนะเพียงไม่กี่ตัว คือ erythromycin และ tetracycline เท่านั้น [44] และมักไม่พบระบบนี้ในเชื้อที่แยกได้ทางคลินิก ที่ผ่านมามีเพียงรายงานเดียวที่พบ MexJK ในเชื้อที่แยกได้ทางคลินิกและ coexpression ร่วมกับ MexXY [45] ซึ่งเสนอว่า cefepime ไม่ใช่ substrate ของระบบ MexJK แต่ไม่ได้ทำการศึกษาร่วมต่อการดื้อยาชนิดอื่นๆ ของระบบนี้และไม่ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ในยีน *mexL* ซึ่งเป็น regulatory gene ของระบบด้วย

เชื้อจำนวน 11 isolates มีการแสดงออกของ MexF มากกว่า PAO1 อย่างน้อย 2 เท่า (2.5-26.2 fold) ระบบ MexEF-OprN เป็นระบบที่เริ่มต้นที่เป็น normalacy-silent system และต่อมาพบว่าการแสดงออกที่ระดับต่ำใน widdtype ที่เป็นเชื้อในห้องปฏิบัติการและไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ [42] แต่การตัดยีนของระบบออกส่งผลให้เชื้อลดความไวต่อ chloramphenicol และ ciprofloxacin ซึ่งเป็น substrate ที่รู้จักดีของระบบ ระดับการแสดงออกของระบบ MexAB-OprM แปรผกผันกับการแสดงออกของระบบ MexEF-OprN [42] ในการวิจัยครั้งนี้พบว่า เชื้อที่การแสดงออกของ MexEF-OprN ในระดับต่ำก็มีระดับการแสดงออกของ MexAB-oprM ฝนระดับด้วย (PAJ111, PAJ147, PAJ214 และ PAJ189) ดังนั้นระดับการแสดงออกของระบบ MexEF-OprN ไม่ได้แปรผกผันกับการแสดงออกของระบบ MEXAB-OprM เสมอไปโดยเฉพาะใน clinical isolates ระบบ MexEF-OprN ไม่มี β -lactams เป็น substrates เนื่องจากเชื้อทั้งหมดมีค่า MICs ต่อยาปฏิชีวนะที่เป็น substrates ของระบบ MexEF-OprN ในระดับที่สูง ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบการทำงานของระบบกับการมีส่วนร่วมในการดื้อยาเหล่านี้ได้ การเพิ่มระดับการแสดงออกของระบบ MexEF-OprN จะพบควบคู่กับการลดระดับการแสดงออกของ OprD ซึ่งการสูญเสียหรือลดลงของ OprD มีผลทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวเห็นได้ชัดเจนในเชื้อบางตัว เช่น PAJ107, PAJ111 ที่มีระดับการแสดงออกของ MexEF-OprN ต่ำแต่ระดับการแสดงออกของ OprD สูงหรือในทางตรงกันข้าม PAJ191, PAJ197, PAJ207 ที่มีระดับการแสดงออกของ MexEF-OprN สูงแต่ระดับการแสดงออกของ OprD ต่ำ อย่างไรก็ตาม ค่า MIC ของ imipenem ในเชื้อทั้ง 2 ชุดไม่แตกต่างกัน แสดงว่ายังมีกลไกอื่นๆ ที่ควบคุมการดื้อยา imipenem ใน PAJ107 และ PAJ111 ส่วนในเชื้อตัวอื่นๆ ระดับการแสดงออกของ MexEF-OprN และ OprD ไม่แตกต่างหรือไม่แปรผกผันกัน (PAJ127 PAJ172 และ PAJ166) ซึ่งสนับสนุนว่า coregulation ของระบบ MexEF-OprN และ OprD ไม่เกิดขึ้นเสมอไป [46] ที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งเชื้อเหล่านี้เป็น *nfxC* mutants ซึ่งมียา quinolones chloramphenicol carbapenam และ carbpenem เป็น substrates ที่สำคัญ แต่เชื้อ PAJ208 กลับไวต่อ ciprofloxacin (MIC 1 μ g/ml) ทั้งที่มีการแสดงออกของ MexEF-OprN ในระดับสูง (11.8 fold)

เชื้อจำนวน 10 isolates มีการแสดงออกของระบบ MexVW (2.15-583.6 fold) และระดับการแสดงออกของระบบในเชื้อบางตัวอยู่ในระดับสูง ซึ่งที่ผ่านมามีรายงานศึกษาระบบนี้ใน clinical isolates เท่านั้น [47] ผลการวิจัยครั้งนี้เป็นรายงานแรกของการแสดงออกของระบบนี้ในเชื้อที่แยกได้ทางคลินิก โดยได้ยืนยันความจำเพาะของ Realtime PCR โดยส่ง PCR products ไปถอดรหัสพันธุกรรมและทำ melt curve analysis

นอกจากนี้แล้วเชื้อ PAJ111 ต่อยาปฏิชีวนะที่ทดสอบหลายชนิดและดื้อในระดับสูง เชื้อตัวนี้มีการแสดงออกของ 2 ระบบคือ MexVW และ MexXY ในระดับสูง ซึ่งแสดงถึงบทบาทของ MexVW ที่อาจมีต่อการดื้อยาของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิก อย่างไรก็ตามไม่ได้ทำการศึกษาส่วนร่วมที่แท้จริงของระบบนี้

เมื่อพิจารณาที่ regulatory gene พบว่ามีความแตกต่างจากเชื้อที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการ เชื้อที่มีการแสดงออกของ MexB สูงกว่า PAO1 จำนวน 5 isolates โดยเชื้อจำนวน 1 isolates เท่านั้นที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *mexR* (PAJ208) และเป็น *nalB* mutant เชื้ออีก 4 isolates (PAJ107, PAJ151, PAJ197, PAJ207) ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *mexR* และเป็น *nalC* mutant ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่า *nalC* mutant มีการกลายพันธุ์ใน PA3721 [40] ถ้าไม่มีจะเป็น *nalD* mutant แต่ไม่ได้ทำการศึกษาขึ้นดังกล่าวในครั้งนี้ เชื้อ PAJ214 มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *mexR* แต่ระดับการแสดงออกของ MexB ไม่ต่างจาก PAO1 (1.8 fold) ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้มีผลต่อการเพิ่มระดับการแสดงออกของ MexAB-OprM เพียงเล็กน้อยเท่านั้น [48]

การแสดงออกของ MexXY อยู่ภายใต้การควบคุมของยีน *mexZ* เชื้อส่วนใหญ่ (8 isolates) มี partial deletion จำนวน 72 bp ในยีน *mexZ* ซึ่งกลายพันธุ์แบบนี้เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แต่ที่ตำแหน่งต่างกัน [49] [50] เชื้อ PAJ191 มีระดับการแสดงออกของระบบนี้สูงสุด แต่ไม่สามารถ amplify ยีน *mexZ* ได้ทั้งที่พยายามแก้ไขหลายวิธี เชื้อบางตัว (PAJ111, PAJ189 และ PAJ208) ไม่มีการกลายพันธุ์ในยีน *mexZ* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ทั้งในเชื้อที่แยกได้จากคนและสัตว์ที่ยังมียีนอื่นๆ นอกเหนือจากยีน *mexZ* ที่ควบคุมการแสดงออกของ MexXY [51, 52]

เชื้อทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *ngxB* เลยซึ่งสอดคล้องกับการที่พบว่าเชื้อเหล่านี้ไม่มีการแสดงออกของระบบ MexCD-OprJ

การควบคุมการแสดงออกของระบบ MexEF-OprN แตกต่างจากระบบอื่นๆ ใน the RND family เพราะมี positive regulator คือยีน *mexT* ที่มีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกับ operon ของระบบและไม่ใช่ repressor ซึ่ง sequence ของยีน *mexT* มีความหลากหลายและแตกต่างจากยีน *mexT* ของ PAO1 wildtype ดังนั้นการทำงานของยีนนี้ (activation) จึงเป็นไปได้ในหลายรูปแบบ เชื้อทั้ง 13 isolates ไม่มี 8bp-insertion ที่พบในยีน *mexT* ของ PAO1 wildtype ซึ่งเป็น *ngxC* type mutants ที่มี additional mutation ส่งผลให้เปลี่ยน MexT จาก inactive เป็น active form [53] โดยแต่ละตัวมีการกลายพันธุ์เพิ่มเติมคือ Phe(TTC)-129-Ile(ATC) อย่างไรก็ตามเชื้อที่มีการกลายพันธุ์รูปแบบนี้มีระดับการแสดงออกของ MexF ที่แตกต่างกัน (0.9-26.2 fold) ดังนั้นการกลายพันธุ์นี้อาจไม่มีผลใดๆ ต่อการทำงานของ MexT และอาจเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรม (strain variation) ของเชื้อในโรงพยาบาลหรือประเทศไทยก็ได้ ในขณะที่เชื้อ 2 isolates (PAJ107 และ PAJ111) ที่มีระดับการแสดงออกของระบบ MexEF-OprN ไม่แตกต่างจาก PAO1 (0.9 และ 1.5 fold ตามลำดับ) มีการกลายพันธุ์อีก 1 รูปแบบเพิ่มเติมในยีน *mexT* คือ Leu(TTG)115Met(ATG) แสดงว่า การกลายพันธุ์นี้มีผลทำให้โปรตีน MexT ไม่สามารถทำหน้าที่เป็น activator ได้ เชื้อ PAJ189 ไวต่อ ciprofloxacin (MIC 0.5

$\mu\text{g/ml}$) และ imipenem (MIC 16 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งมีระดับการแสดงออกของ MexEF-OprN ไม่สูงมากนัก (2.5 fold) ทั้งที่มี active MexT มีเชื้ออีก 2 isolates ที่มี active MexT และระดับการแสดงออกของ MexEF-OprN ไม่สูง (2.5-2.7 fold) คือ PAJ147 และ PAJ214 ซึ่งต้องอาศัยชีวหน้าที่เป็น substrate ของระบบ แสดงว่าการดื้อยาเหล่านี้ไม่ได้เป็นผลมาจากการแสดงออกของระบบ MexEF-OprN

การแสดงออกของ MexJK เป็นผลจากการกลายพันธุ์ในยีน *mexL* ซึ่งอยู่ใน the TetR family เช่นเดียวกับยีน *mexZ* เชื้อเพียงตัวเดียวที่มีการแสดงออกของระบบ PAJ166 กลับไม่มีการกลายพันธุ์ในยีน *mexL* ในทางตรงกันข้ามเชื้อ PAJ208 และ PAJ214 มีการกลายพันธุ์ในยีน *mexL* แต่ระดับการแสดงออกของระบบไม่ต่างจาก PAO1 ซึ่งการกลายพันธุ์ Ser(TCC)4Pro(CCC) และ Ser(TCC)6Phe(TTC) อยู่นอก helix-turn-helix domain ของ MexL (ประเมินด้วยโปรแกรม DomPred (Protein Domain Prediction), <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/>) ซึ่งเป็น DNA binding region อาจไม่มีผลใดๆต่อการควบคุมแสดงออกของ MexJK สำหรับ และ His(CAC)163Arg(CGC) ไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้เป็นการยืนยันความซับซ้อนของการควบคุมการแสดงออกของระบบ MEX ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิก

4. บทบาทของระบบ MexAB-OprM ต่อการดื้อยาในกลุ่ม β -lactams

ระบบ MexAB-OprM เป็นระบบที่แสดงออกอย่างตลอดเวลาในระดับต่ำและมีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาโดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) ของเชื้อ *P. aeruginosa* โดยสามารถส่งออกยาปฏิชีวนะ (substrates) หลายชนิดและที่เป็นยาปฏิชีวนะจำเพาะคือ β -lactams ดังนั้นจึงเลือก carbenicillin เป็น indicator สำหรับการแสดงออกของระบบ MexAB-OprM ในการวิจัยครั้งนี้ โดย efflux pump inhibitor ที่ใช้คือ PA β N ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของระบบ MEX ในวงศ์ตระกูล RND โดย PA β N สามารถลดค่า MIC ของ carbenicillin ใน PAO1 จาก 512 $\mu\text{g/ml}$ เป็น 64 $\mu\text{g/ml}$ (3 fold) จากการที่ PAO1 ยังคงมีค่า MIC ที่ 64 $\mu\text{g/ml}$ ทั้งที่ MexAB-OprN ถูกยับยั้งด้วย PA β N แสดงว่ายังมีระบบอื่นๆที่ทำงานทำให้เชื้อยังสามารถทนต่อยานี้ได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งลักษณะเช่นนี้เห็นได้ในเชื้ออีก 3 isolates คือ PAJ189 (16 fold), PAJ212 (3 fold) และ PAJ215 (2 fold) โดยในเชื้อ PAJ215 มีการเปลี่ยนแปลง 2 fold เท่านั้น ส่วนในเชื้ออีก 4 isolates ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า MIC ของ carbenicillin เมื่อเติม PA β N แสดงว่า ระบบ MexAB-OprM ไม่มีส่วนร่วมหรือมีน้อยหรือการสูญเสีย ระบบ MexAB-OprM ถูก compensate ด้วยระบบอื่นๆที่ไม่ได้ศึกษาในครั้งนี้ เช่น เอนไซม์ β -lactamase

5. เทคนิคการตรวจการดื้อยาด้วยระบบ multidrug efflux systems

จากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของการแสดงออกของระบบ MEX ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิก ซึ่งมีแนวโน้มที่จะมีการแสดงออกของระบบต่างๆ มากกว่า 1 ระบบ พร้อมกัน จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าระบบที่มีความสำคัญทางต่อการดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาคือ MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN และ MexXY ดังนั้นการพัฒนาระบบการตรวจการแสดงออกของทั้ง 4 ระบบพร้อมกันได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

การใช้ multiplex RT-PCR จะสามารถตรวจการแสดงออกของระบบในระดับ transcription โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อระบบ ซึ่งพบว่าสามารถตรวจการแสดงออกของระบบทั้ง 4 ได้ เนื่องจาก multiplex RT-PCR ที่ใช้ยังต้องมีการ run DNA บน agarose gel ซึ่งทำให้เสียเวลามากขึ้น ดังนั้นควรมีการพัฒนาต่อไปเพื่อให้สามารถตรวจได้เร็วขึ้น เช่น การใช้ real-time PCR เป็นต้น นอกจากนี้ยังต่อไปปรับสถานะในการ amplification และส่วนประกอบของปฏิกิริยาเพื่อให้สามารถได้ products ที่มีคุณภาพดี ลด non specific bands และอ่านผลได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

โดยสรุป โครงการวิจัยครั้งนี้ได้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ โดยดำเนินการไปตามแผนที่วางไว้และสามารถสรุปได้ว่า

1. ระบบ Multidrug Efflux Pumps มีบทบาทสำคัญต่อการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิก
2. ระบบ Multidrug Efflux Pumps มีการแสดงออกใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิกทุกตัว โดยมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน
3. การมีส่วนร่วมของระบบ Multidrug Efflux Pumps ในการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิกมีความหลากหลาย
4. การควบคุมการแสดงออกของระบบ Multidrug Efflux Pumps ใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิกมีความซับซ้อน
5. สามารถพัฒนาการตรวจการแสดงออกของระบบที่มีความสำคัญทางคลินิก 4 ระบบได้ด้วย multiplex RT-PCR

ผลการวิจัยยืนยันความเป็น dynamics ของการดื้อยาใน *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิกที่มีความแตกต่างและมีความซับซ้อนมากกว่าเชื้อที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถนำผลการวิจัยและเชื้อที่ได้จากการวิจัยไปต่อการศึกษาดังนี้

1. การศึกษาส่วนร่วมที่แท้จริงของแต่ละระบบด้วยเทคนิค genetic knockout
2. การพัฒนา efflux pump inhibitor ซึ่งจากผลการวิจัยที่พบว่าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่แยกได้ทางคลินิกทุกตัวมีการแสดงออกของระบบ MEX อย่างน้อย 1 ชนิด แต่มีความแตกต่างและมีความซับซ้อน ดังนั้นในการออกแบบ efflux pump inhibitor ควรเป็นสารที่ออกฤทธิ์ได้กับทุกระบบ เช่น energy uncoupler ที่ทำลาย proton motive force ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของระบบ MEX ใน the RND family, transporter blocker ที่ยับยั้งการทำงานของ transporter ของระบบ เป็นต้น
3. การพัฒนาชุดทดสอบเพื่อการตรวจการแสดงออกของระบบ ที่สามารถนำไปใช้ได้จริงในห้องปฏิบัติการชันสูตรวินิจฉัยโรคของโรงพยาบาลต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Martin Barrasa, J.L., et al., *Antibacterial susceptibility patterns of Pseudomonas strains isolated from chronic canine otitis externa*. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health, 2000. **47**(3): p. 191-6.
2. Daly, M., et al., *Molecular analysis of Pseudomonas aeruginosa: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds*. Appl. Environ. Microbiol., 1999. **65**(6): p. 2723-9.
3. Las Heras, A., et al., *Outbreak of acute ovine mastitis associated with Pseudomonas aeruginosa infection*. Vet. Rec., 1999. **145**(4): p. 111-2.
4. Cutler, K.L., *Gangrenous mastitis in dairy herds*. Vet. Rec., 2003. **153**(24): p. 758-9.
5. Hammer, A.S., et al., *Comparison of Pseudomonas aeruginosa isolates from mink by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis*. Vet. Microbiol., 2003. **94**(3): p. 237-43.
6. Tassios, P.T., et al., *Multiresistant Pseudomonas aeruginosa serogroup O:11 outbreak in an intensive care unit*. Clin. Microbiol. Infect., 1997. **3**(6): p. 621-628.
7. Rubin, J., et al., *Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from canine infections*. Vet. Microbiol., 2008. **131**(1-2): p. 164-72.
8. Pedersen, K., et al., *Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs*. J. Antimicrob. Chemother., 2007. **60**(4): p. 775-81.
9. Putman, M., H.W. Van Ween, and W.N. Konings, *Molecular properties of bacterial multidrug transporters*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2000. **64**: p. 672-693.
10. Schweizer, H.P., *Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in Pseudomonas aeruginosa and related bacteria: unanswered questions*. Genet. Mol. Res., 2003. **2**(1): p. 48-62.
11. Schweizer, H.P., *Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics*. FEMS Microbiol. Lett., 2001. **202**: p. 1-7.
12. Moellering, R.C., Jr., *Antibiotic resistance: lessons for the future*. Clin. Infect. Dis., Suppl., 1998. **1**: p. S135-S140.
13. Watson, J.M. and B.W. Holloway, *Chromosome mapping in Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 1978. **133**: p. 1113-1125.
14. Westbrook-Wadman, S., et al., *Characterization of a Pseudomonas aeruginosa efflux pump contributing to aminoglycoside resistance*. Antimicrob. Agents Chemother., 1999. **43**: p. 2975-2983.
15. Chuanchuen, R., et al., *Cross-resistance between triclosan and antibiotics in Pseudomonas aeruginosa is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ*. Antimicrob. Agents Chemother., 2001. **45**: p. 428-432.
16. Chuanchuen, R., et al., *Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the Pseudomonas aeruginosa MexJK efflux pump*. Antimicrob. Agents Chemother., 2005. **49**(5): p. 2133-6.
17. Chuanchuen, R., C.T. Narasaki, and H.P. Schweizer, *The MexJK efflux pump of Pseudomonas aeruginosa requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan*. J. Bacteriol., 2002. **184**: p. 5036-5044.

18. NCCLS, *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition*. NCCLS document M31-A2. 2002, PA, USA: NCCLS. 84.
19. Shawar, R.M., et al., *Activities of tobramycin and six other antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 2877-80.
20. Schweizer, H.P., *Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems*. Antimicrob. Agents Chemother., 1998. **42**: p. 394-398.
21. Chuanchuen, R., et al., *Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in Salmonella enterica isolates obtained from poultry and swine in Thailand*. J. Vet. Med. Sci., 2008. **70**: p. 595-501.
22. Chuanchuen, R. and P. Padungtod, *Antibiotic Resistance Genes in Salmonella enterica Isolates from Poultry and Swine*. J. Vet. Med. Sci., 2009. **70**: p. 1349-1355.
23. Chuanchuen, R., et al., *Role of the MexXY multidrug efflux pump in moderate aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from Pseudomonas mastitis*. Microbiol. Immunol., 2008. **52**(8): p. 392-8.
24. Hoang, T.T., et al., *A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked Pseudomonas aeruginosa mutants*. Gene, 1998. **212**: p. 77-86.
25. Woods, C.R., et al., *Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates*. J Clin. Microbiol., 1993. **31**(7): p. 1927-31.
26. Amonsin, A., et al., *DNA fingerprinting of Pasteurella multocida recovered from avian sources*. J. Clin. Microbiol., 2002. **40**(8): p. 3025-31.
27. Amonsin, A., et al., *Molecular epidemiology of Ornithobacterium rhinotracheale*. J. Clin. Microbiol., 1997. **35**(11): p. 2894-8.
28. Petersen, A.D., et al., *Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of Staphylococcus intermedius and Pseudomonas aeruginosa isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997)*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 2002. **38**(5): p. 407-13.
29. Sobel, M.L., G.A. McKay, and K. Poole, *Contribution of the MexXY Multidrug Transporter to Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates*. Antimicrobial agents and chemotherapy., 2003. **47**(10): p. 3202-7.
30. Islam, S., et al., *Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients*. Clin. Microbiol. Infect., 2009. **15**(1): p. 60-6.
31. Over, U., et al., *The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey*. Clin. Microbiol. Infect., 2001. **7**(9): p. 470-8.
32. Kim, J.Y., et al., *Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: a Korean nationwide study*. J. Antimicrob. Chemother., 2008. **62**(3): p. 479-83.
33. Vaziri, F., et al., *The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2'')-I, aph (3')-VI) in Pseudomonas aeruginosa*. Clinics (Sao Paulo), 2011. **66**(9): p. 1519-22.

34. Martineau, F., et al., *Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery.* J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(4): p. 527-34.
35. Martineau, F., et al., *Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis.* Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(2): p. 231-8.
36. Miller, G.H., et al., *The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups.* Clin. Infect. Dis., 1997. **24 Suppl 1**: p. S46-62.
37. Sunde, M. and M. Norstrom, *The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in Escherichia coli isolated from Norwegian meat and meat products.* J. Antimicrob. Chemother., 2006. **58**(4): p. 741-7.
38. Poole, K., *Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother., 2005. **49**(2): p. 479-87.
39. Vogne, C., et al., *Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis.* Antimicrob. Agents Chemother., 2004. **48**(5): p. 1676-80.
40. Llanes, C., et al., *Clinical strains of Pseudomonas aeruginosa overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously.* Antimicrob. Agents Chemother., 2004. **48**(5): p. 1797-802.
41. Pumbwe, L. and L.J. Piddock, *Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother., 2000. **44**: p. 2861-2864.
42. Li, X.Z., N. Barre, and K. Poole, *Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in Pseudomonas aeruginosa.* J. Antimicrob. Chemother., 2000. **46**(6): p. 885-93.
43. Llanes, C., et al., *Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of Pseudomonas aeruginosa to ciprofloxacin.* Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(12): p. 5676-84.
44. Chuanchuen, R., C.T. Narasaki, and H.P. Schweizer, *The MexJK efflux pump of Pseudomonas aeruginosa requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan.* J Bacteriol, 2002. **184**(18): p. 5036-44.
45. Hocquet, D., et al., *Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother., 2006. **50**(4): p. 1347-51.
46. Lister, P.D., D.J. Wolter, and N.D. Hanson, *Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms.* Clin. Microbiol. Rev., 2009. **22**(4): p. 582-610.
47. Li, Y., et al., *A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in Pseudomonas aeruginosa.* J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(4): p. 572-5.
48. Adewoye, L., et al., *The MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in Pseudomonas aeruginosa: characterization of mutants compromising activity.* J. Bacteriol., 2002. **184**: p. 4308-4312.

49. Cabot, G., et al., *Genetic markers of widespread extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa high-risk clones*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(12): p. 6349-57.
50. Feliziani, S., et al., *Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis chronic airways infections*. PLoS One, 2010. **5**(9).
51. Poonsuk, K., C. Tribuddharat, and R. Chuanchuen, *Aminoglycoside resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa isolates from non-cystic fibrosis patients in Thailand*. Can J Microbiol, 2013. **59**(1): p. 51-6.
52. Chuanchuen, R., et al., *Role of the MexXY multidrug efflux pump in moderate aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from Pseudomonas mastitis*. Microbiol Immunol, 2008. **52**(8): p. 392-8.
53. Maseda, H., et al., *Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett., 2000. **192**: p. 107-112.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. Poonsuk, K., C. Tribuddharat and **R. Chuanchuen**. 2012. Aminoglycoside-resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from non-cystic fibrosis patients. Canadian Journal of Microbiology. **59(1):51-56**.
2. Poonsuk, K and **R. Chuanchuen**. 2012. Contribution of the MexXY multidrug efflux pump and other chromosomal mechanisms on aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine and feline infections. Journal of Veterinary Medical Science. **74(12):1575-1582**.
3. Poonsuk, K., C. Tribuddharat and R. Chuanchuen. Simultaneous Expression of Multidrug Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. **Manuscript in preparation**.
4. Poonsuk, K. and R. Chuanchuen. The combination of resistance phenotype and multiplex RT-PCR for detection of the Mex systems in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. **Manuscript in preparation**.

ภาคผนวก

The Journal of Veterinary Medical Science

Vol. 74, No. 11, 2012

CONTENTS

Anatomy:

- Comparative Study of Cardiac Anatomic Measurements Obtained by Echocardiography and Dual-Source Computed Tomography—PARK, N., LEE, M., LEE, A., LEE, S., LEE, S., SONG, S., JUNG, J. and EOM, K. 1597–1602

- Sexual Dimorphism of Craniodental Morphology in the Raccoon Dog *Nyctereutes procyonoides* from South Korea—KIM, S., SUZUKI, S., OH, J., KOYABU, D., OSHIDA, T., LEE, H., MIN, M. and KIMURA, J. 1609–1616

Avian Pathology:

- Simple Differentiation of Avirulent and Virulent Strains of Avian Paramyxovirus Serotype-1 (Newcastle Disease Virus) by PCR and Restriction Endonuclease Analysis in Japan (NOTE)—MASE, M. and KANEHIRA, K. 1661–1664

Bacteriology:

- Contribution of the MexXY Multidrug Efflux Pump and Other Chromosomal Mechanisms on Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Canine and Feline Infections—POONSUK, K. and CHUANCHUEN, R. 1575–1582

- Isolation and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococci from Horses, Personnel and Environmental Sites at an Equine Hospital in Turkey—ASLANTAŞ, Ö., TÜRKÜYLMAZ, S., YILMAZ, M. A., ERDEM, Z. and DEMIR, C. 1583–1588

- Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in Isolates from Porcine Endocarditis in East Japan (NOTE)—ONISHI, H., SUGAWARA, M., OKURA, M., OSAKI, M. and TAKAMATSU, D. 1681–1684

Clinical Pathology:

- Effects of Serum Proteins on *In Vitro* Melamine-Cyanurate Crystal Formation—TAKSINOROS, S. and MURATA, H. 1569–1573

Immunology:

- Construction of Swine-Specific CpG Motif Enriched Plasmid and the Study of Its Immunostimulatory Effects Both *In Vitro* and *In Vivo* (NOTE)—GUO, X., JIA, H., YUAN, W., ZHANG, Q., HOU, S., SUN, Y., ZHU, G., ZHU, H. and SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. 1647–1650

- Oxygenated Drinking Water Enhances Immune Activity in Pigs and Increases Immune Responses of Pigs during *Salmonella* Typhimurium Infection (NOTE)—JUNG, B., LEE, J. and LEE, B. 1651–1655

Internal Medicine:

- An Epidemiological Survey of Hemoplasma Infection in Iriomote Cats (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*)—HIRATA, M., TATENO, M., SAKUMA, M., NAKANISHI, N., IZAWA, M., ASARI, Y., OKAMURA, M., MIYAMA, T. S., SETOGUCHI, A. and ENDO, Y. 1531–1537

Laboratory Animal Science:

- Improved RNA Extraction Method Using the BioMasher and BioMasher Power-Plus—YAMAMOTO, T., NAKASHIMA, K., MARUTA, Y., KIRIYAMA, T., SASAKI, M., SUGIYAMA, S., SUZUKI, K., FUJISAKI, H., SASAKI, J., KAKU-USHIKI, Y., TANIDA, M., IRIE, S. and HATTORI, S. 1561–1567

- p21 and Notch Signalings in the Persistently Altered Vagina Induced by Neonatal Diethylstilbestrol Exposure in Mice—NAKAMURA, T., MIYAGAWA, S., KATSU, Y., MIZUTANI, T., SATO, T., TAKEUCHI, T., IGUCHI, T. and OHTA, Y. 1589–1595

- Diabetic Peripheral Neuropathy in Spontaneously Diabetic Torii-*Lepr^{fa}* (SDT Fatty) Rats (NOTE)—YAMAGUCHI, T., SASASE, T., MERA, Y., TOMIMOTO, D., TADAKI, H., KEMMOCHI, Y., OHTA, T., SATO, E. and MATSUSHITA, M. 1669–1673

Pathology:

- Incidental Synovial Myxoma with Extensive Intermuscular Infiltration in a Dog (NOTE)—IZAWA, T., TANAKA, M., AOKI, M., OHASHI, F., YAMATE, J. and KUWAMURA, M. 1631–1633

- Mast Cell Sarcoma with Megakaryocytic Differentiation in a Calf (NOTE)—FUJIMOTO, A., WADA, Y., KANADA, T., ISHIKAWA, Y. and KADOTA, K. 1643–1646

Pharmacology:

- Comparison of Gastrointestinal Adverse Effects of Ketoprofen between Adult and Young Cats—TAKATA, K., HIKASA, Y. and SATOH, H. 1545–1550

- Green Tea Catechins Increase the Force of Contraction in Isolated Guinea Pig Atrial Muscle Preparations by Increasing the Amplitude of Intracellular Ca²⁺ Concentration—SASAKI, T., KAMATA, R., UENO, S., KANEDA, T. and TEMMA, K. 1603–1608

Physiology:

- Comparison of Three Thermal Cameras with Canine Hip Area Thermographic Images—VAINIONPÄÄ, M., RAEKALLIO, M., TUHKALAINEN, E., HÄNNINEN, H., ALHOPURO, N., SAVOLAINEN, M., JUNNILA, J., HJELM-BJÖRKMAN, A., SNELLMAN, M. and VAINIO, O. 1539–1544

Public Health:

- Dual Presence of *Anaplasma phagocytophilum* and Its Closely Related *Anaplasma* sp. in Ixodid Ticks in Hokkaido, Japan, and Their Specific Molecular Detection—YBAÑEZ, A. P., MATSUMOTO, K., KISHIMOTO, T., YOKOYAMA, N. and INOKUMA, H. 1551–1560

- Factors for Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Broilers (NOTE)—HIROI, M., MATSUI, S., KUBO, R., IIDA, N., NODA, Y., KANDA, T., SUGIYAMA, K., HARAKUDO, Y. and OHASHI, N. 1635–1637

- Detection and Phylogenetic Analysis of Hepatitis E Viruses from Mongooses in Okinawa, Japan (NOTE)—NIDAIRA, M., TAKAHASHI, K., OGURA, G., TAIRA, K., OKANO, S., KUDAKA, J., ITOKAZU, K., MISHIRO, S. and NAKAMURA, M. 1665–1668

- Early-Stage Bioassay for Monitoring Radioactive Contamination in Living Livestock (NOTE)—YAMAGUCHI, T., SAWANO, K., KISHIMOTO, M., FURUHAMA, K. and YAMADA, K. 1675–1676

Surgery:

- Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow, Wharton's Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in Dogs—RYU, H., KANG, B., PARK, S., KIM, Y., SUNG, G., WOO, H., KIM, W. H. and KWEON, O. 1617–1630

- A Preliminary Study of Diagnostic Color Doppler Ultrasonography in Equine Superficial Flexor Tendonitis (NOTE)—MURATA, D., MISUMI, K. and FUJIKI, M. 1639–1642

Toxicology:

- Relationships between Curved Carapace Sizes and Plasma Major and Trace Element Status in Captive Hawksbill Sea Turtles (*Eretmochelys imbricata*) (NOTE)—SUZUKI, K., NODA, J., YANAGISAWA, M., KAWAZU, I., SERA, K., FUKUI, D., ASAKAWA, M. and YOKOTA, H. 1677–1680

Virology:

- Large-Scale Serological Survey of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) in Korean Black Goats (*Capra hircus aegagrus*) (NOTE)—OEM, J., CHUNG, J., BYUN, J., KIM, H., KWAK, D. and JUNG, B. Y. 1657–1659

Contribution of the MexXY Multidrug Efflux Pump and Other Chromosomal Mechanisms on Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Canine and Feline Infections

Kanchana POONSUK¹⁾ and Rungtip CHUANCHUEN^{1)*}

¹⁾Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

(Received 24 May 2012/Accepted 5 July 2012/Published online in J-STAGE 19 July 2012)

ABSTRACT. As study of multidrug efflux pumps is a crucial step for development of efflux pump inhibitors for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection, the objective of this study was to examine the contribution of the MexXY multidrug efflux systems and other chromosomal mechanisms in aminoglycoside (AMG) resistance in *P. aeruginosa* isolated from dogs and cats. Thirteen *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine and feline infections were examined for contribution of the MexXY multidrug efflux pump and four other chromosomally-encoded genes including PA5471, *galU*, *nuoG* and *rplY* to AMG resistance. All the isolates were resistant to multiple AMGs and expressed *mexXY*. Deletion of *mexXY* caused 2- to 16-fold reduction in AMG MICs. Overproduction of MexXY did not fully account for the observed AMG resistance. No good correlations were detected between MexXY transcription level and AMG MICs. While no mutations were found in *mexZ*, PA5471 expression varied and its impact on MexXY expression and AMG resistance is diverse. No mutations were found in *galU*. Only two isolates carried a single base change G-367-T in *rplY*. Complete transcription of *nuoG* was detected in all the isolates. In conclusion, the MexXY multidrug efflux pump plays a role in AMG resistance in the dog and cat *P. aeruginosa* isolates, while disruption of *nuoG*, *rplY* and *galU* did not have a significant impact. These results indicate the existence of uncharacterized AMG-resistance mechanisms.

KEY WORDS: aminoglycoside resistance, *mexXY*, *Pseudomonas aeruginosa*.

doi: 10.1292/jvms.12-0239; J. Vet. Med. Sci. 74(12): 1575–1582, 2012

Pseudomonas aeruginosa is infamously known as a common cause of chronic and recurrent infections in both humans and animals, of which the most-notably diseases in dogs and cats include otitis externa/media, urinary tract infection and pyoderma [9, 10, 20]. Treatment of *P. aeruginosa* infection is challenging, because the pathogen intrinsically exhibits and efficiently develops high resistance to several antimicrobials structurally and functionally unrelated, leading to multidrug resistance [1, 24].

As many antipseudomonal drugs are available for therapeutic use in dogs and cats, aminoglycosides (AMGs) are considered a vital component of antipseudomonal chemotherapy [22] due to their efficacy, safety and reasonable price. However, panaminoglycoside resistance e.g., gentamicin, spectinomycin, streptomycin and amikacin has been increasingly reported in the *P. aeruginosa* dog and cat isolates [18, 19, 23]. Such resistance has been clarified to be predominantly due to a poorly understood mechanism namely “impermeability resistance” as a consequence of diminished drug uptake and/or accumulation [21, 31]. The MexXY efflux system, a multidrug efflux pump in the resistance-nodulation-cell-division (RND) family, is involved in the reduced level of AMG accumulation implicated in both impermeability-type and adaptive-type AMG

resistance [12, 21, 22]. The MexXY efflux pump is encoded by the *mexXY* operon and evidently serves as the major AMG-resistance mediating system in *P. aeruginosa* clinical isolates. This system additionally confers resistance to nonaminoglycosides, including tetracycline, erythromycin and fluoroquinolones [16]. Inhibition of the MexXY efflux pump appears to be a promising approach for restoring the activity of the existing antimicrobials and improving the *P. aeruginosa* infection [27]. In addition to MexXY, chromosome-encoded genes including *mexZ*, PA5471, *nuoG*, *rplY* and *galU* have a cumulative contribution to AMG MICs in the *P. aeruginosa* laboratory strain [8].

MexZ is the TetR family transcriptional regulator that binds to the *mexZ-mexX* intergenic region located between positions –104 to –66 bp and represses transcription of the *mexXY* operon [17]. Recently, PA5471-dependent overexpression of MexXY was demonstrated. The PA5471 product modulates transcription of MexXY by binding to MexZ and reduced MexZ DNA-binding ability [34]. The combination amino acid substitution in MexZ and overexpression of PA5471 causes increased *mexXY* expression, leading to AMG resistance. Individual disruption of *nuoG*, *rplY* and *galU* led to gradual increases in AMG MICs in PAO1. The *nuoG* gene belongs to the *nuoABCDEFGHIJKLMN* operon and encodes type I NADH dehydrogenase required for the synthesis of protonmotive force [26]. Inactivation of *nuoG* results in impaired membrane energy, leading to decreased AMG uptake. The *rplY* gene encodes the L25-ribosomal protein that is an AMG-target site, therefore, mutations in

*CORRESPONDENCE TO: CHUANCHUEN, R., Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
e-mail: rchuanchuen@yahoo.com

Table 1. Bacterial strains and plasmid used in this study

Strain	Relevant properties	Source or reference
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type expressing MexAB-OprM	[29]
PA049	PAO1Δ(<i>mexXY</i>):FRT	[4]
PA3579	PAO1 with Δ <i>mexZ</i>	[31]
PAO267	PA3579 with Δ(<i>mexAB-oprM</i>)	[1]
PAO280	PA267 with Δ(<i>mexXY</i>)	[1]
Clinical isolates		
PAJ226 and PAJ245	Pus from wounds in a cat	This study
PAJ228, PAJ230 and PAJ238	Feline nasal cavity	This study
PAJ227 and PAJ229	Urine from a cat	This study
PAJ233 and PAJ239	Pus from wounds in a dog	This study
PAJ232, PAJ234 and PAJ240	Canine otitic ears	This study
PAJ235	Urine from a dog	This study
Δ(<i>mexXY</i>) mutants		
PAJ262	PAJ226Δ(<i>mexXY</i>):FRT	This study
PAJ264	PAJ227Δ(<i>mexXY</i>):FRT	This study
PAJ266	PAJ229Δ(<i>mexXY</i>):FRT	This study
PAJ268	PAJ230Δ(<i>mexXY</i>):FRT	This study
PAJ270	PAJ232Δ(<i>mexXY</i>):FRT	This study
PAJ272	PAJ234Δ(<i>mexXY</i>):FRT	This study
PAJ274	PAJ239Δ(<i>mexXY</i>):FRT	This study
PAJ277	PAJ240Δ(<i>mexXY</i>):Gm ^r -FRT	This study
PAJ276	PAJ245Δ(<i>mexXY</i>):FRT	This study
<i>E. coli</i>		
SM10	Donor for biparental mating <i>thi-1 thr leu tonA lacy supE recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu (Km ^r)	[6]
Plasmid		
pUCP20	Ap ^r , a cloning vector	[30]
pPS1221	Ap ^r , Gm ^r , pEX18Ap containing Δ(<i>mexXY</i>)::FRT-Gm ^r fragment	[2] [31]
pAMR1	Ap ^r , pUCP20 carrying <i>mexXY</i>	

Abbreviations: Ap^r, ampicillin resistance; Gm^r, gentamycin resistance, Km^r, kanamycin resistance.

this region contribute to resistance to AMGs [8]. The *galU* gene encodes UDP-glucose pyrophosphorylase essential for the synthesis of LPS-outer core. The disrupted *galU* gene leads to the production of the A and B band-deficient LPS that adversely affects AMG binding and impairs their outer membrane uptake [7]. However, it was recently shown that inactivation of *nuoG*, *rplY* and *galU* did not play an important role in AMG resistance in the *P. aeruginosa* cystic fibrosis (CF) isolates [14].

Up to date, efflux pump inhibitors for combating antimicrobial resistance caused by multidrug efflux pumps have been researched only for medical treatment in humans [27]. These molecules could be discovered and/or developed as a novel strategy for treatment of *P. aeruginosa* infection in dogs and cats. In this case, study of contribution and functions of multidrug efflux pumps in antimicrobial resistance is a crucial step to achieve the new therapeutic goal. However, role of MexXY in AMG resistance has been systematically studied in *P. aeruginosa* from CF patients [13, 28, 33]. In contrast, such information is still limited in the *P. aeruginosa* veterinary isolates. We previously examined contribution of the MexXY efflux pump in AMG resistance in the isolates from cow mastitis [4]. However, there have been no published data on the MexXY efflux pump of the *P. aeruginosa* isolates from dogs, and cats, and different types of antimicrobials are used in food-producing, and companion animals. Therefore, the aim of this study was to investigate the involvement of MexXY in AMG resistance in the *P. aeruginosa* clinical isolates from dogs and cats. Additional-

chromosomal mechanisms including PA5471, *nuoG*, *rplY* and *galU* were also examined.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions: All the bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. Thirteen *P. aeruginosa* clinical isolates were obtained from the strain collection of the Veterinary Diagnostic Laboratory (VDL), Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University. They were originated from samples that were collected from dogs and cats at Small Animal Hospital during 2005–2010 and submitted for bacterial isolation at the VDL. These dogs and cats were from different households.

Isolation of *P. aeruginosa* was performed using standard methods [15]. Briefly, the bacteria were isolated on blood agar. The colonies with hemolytic zone and pyocyanin-nonfluorescent bluish pigment were collected and further confirmed to be *P. aeruginosa* by using biochemical tests. Only a single *P. aeruginosa* colony was taken from each positive sample at only one time. The bacterial isolates were grown either on Luria Bertani (LB) agar (Difco, BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, U.S.A.), in LB broth (Difco), in Mueller-Hinton broth (MHB; Difco) with adjusted concentrations of Ca²⁺ and Mg²⁺ and on Mueller-Hinton agar (MHA; Difco). Antibiotics used in selective medium were as follows: ampicillin, 100–150 µg/ml and gentamicin, 15 µg/ml for *Escherichia coli* and carbenicillin, 200 µg/ml and

Table 2. Primers used in this study

Gene/region	Primer	Sequence (5'–3')	Reference
Mutation			
<i>mexZ</i> - <i>mexZX</i> intergenic region	mexZXup	CGCAGAAATCCGGCGTCCGC	[4]
	mexZXdown	GCAAGCTTCTGCACATCAGCGAG	
<i>rplY</i>	rplYF144-U	ATCGCCCGAACGCTGGT	[14]
	rplYF144-L	ATGCCGGGTCTGGTCTGATTC	
<i>galU</i>	galUF140-U	CGAGCGCAGCCTGATTAGACT	[14]
	galUR1121-L	ACAGCTCAGGTAGGGCGGATA	
RT-PCR			
<i>mexY</i> ^{a)}	mexYRTUP	AGCTACAACATCCCCTA	[4]
	mexYRTdown	AGCACGTTGATCGAGAAG	
<i>nuoH</i>	nuoHF657-U	GCAGGAAGTGGCGGACGG	[14]
	nuoHL823-L	GGTCTTGGCGGCGAAGTAGAA	
qRT-PCR			
PA5471	PA5471-U	CGACATCGGCTGTGGCA	[14]
	PA5471-L	AGTCGCTCCAGGTCTCGTC	
<i>rpsL</i>	rpsLrealtimeup	CGGCACTGCGTAAGGTATG	[4]
	rpsLrealtimedown	CCCGGAAGGTCCTTACACG	
AMG-Modifying enzymes			
<i>aadA1</i>	aadA1-F	CTCCGCAGTGGATGGCGG	[3]
	aadA1-R	GATCTGCGCGCAGGCCA	
<i>aadA2</i>	aadA2-F	CATTGAGCGCCATCTGGAAT	[3]
	aadA2-R	ACATTTTCGCTCATCGCCGGC	
<i>aadB</i>	aadB-F	CTAGCTGCGGCAGATGAGC	[3]
	aadB-R	CTCAGCCGCCTCTGGGCA	
<i>aac(3')-Ia</i>	aac3Iaup	CTGACCAAGTCAAATCCATGCGGG	[4]
	aac3Iadown	CCACTGCGGGATCGTCACCG	
<i>aac(6')-IIa</i>	aac6IIaup	AGAGCGATGGCGGAAGAGTCC	[4]
	aac6IIadown	ATCCTGCCTTCTCATTGCAGCG	
<i>aac(6')-IIb</i>	aac6IIbup	CCGAAGAAGGAGTGACGCCG	[4]
	aac6IIbdown	GCGCAAACCGTTCACCAACGG	
<i>aph(3')-IIb</i>	aph3IIbup	GAACGAAACCCAGAGCGACGG	[4]
	aph3IIbdown	CAATCGATGAAGCCGCTGAAGC	
<i>ant(2'')-Ia</i>	ant2Iaup	TGGAGCAGCAACGATGTTACGC	[4]
	ant2Iadown	CCACTGGTGGTACTTCATCGG	
<i>strA</i>	strA-F	TGGCAGGAGGAACAGGAGG	[3]
	strA-R	AGGTGATCAGACCCGTGC	
<i>strB</i>	strB-F	GCGGACACCTTTTCCAGCCT	[3]
	strB-R	TCCGCCATCTGTGCAATGCG	

a) Also used for qRT-PCR of *mexY*.

gentamicin, 50 µg/ml for *P. aeruginosa*. *E. coli* SM10 was a donor in conjugation experiment.

Antimicrobial susceptibility testing: Antimicrobial susceptibilities were examined by determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) using the standard two-fold microdilution technique according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI) [5]. The MIC breakpoints used in this study were from CLSI, when available (Table 3). However, the specific-CLSI breakpoints for *P. aeruginosa* are not available for all antimicrobials (i.e., streptomycin, neomycin and tobramycin). Therefore, the CLSI interpretive breakpoints for the Enterobacteriaceae and those in the published data were used for the antimicrobials lacking the CLSI breakpoints [23]. Experiments were performed in triplicates and repeated independently twice. *P. aeruginosa* ATCC 27853 and wildtype PAO1 were used as quality control organisms.

General DNA techniques: Chromosomal DNA was extracted and purified using the QIAamp mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Plasmid DNA was prepared using QIA-

prep® Mini-spin kit (Qiagen). Selected DNA fragments were purified from agarose gels using QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen).

Construction of unmarked chromosomal $\Delta(mexXY)$ mutants: pPS1221 was used as a source for $\Delta(mexXY)$ mutant alleles [2] to delete chromosomal *mexXY* operon by using Flp/FRT recombinase-mediated excision technology as previously described [1, 11]. Gene replacement at the *mexXY* operon was confirmed by PCR and DNA sequencing analyses. Resistance phenotypes of the parents and their corresponding $\Delta(mexXY)$ mutant derivatives were confirmed by complementation analyses using pAMR-1 [31].

PCR, reverse transcription (RT)-PCR and DNA sequencing: PCR amplifications were performed using KAPATaq ReadyMix DNA polymerase (Kapabiosystems, Boston, MA, U.S.A.) by following the manufacturer's protocol. All the primer pairs used for PCR amplification are listed in Table 2. The DNA fragments encompassing *mexZ* and the *mexZ-mexX* intergenic region, *rplY* and *galU* were PCR-amplified from genomic DNA template. All the AMG-modifying en-

Table 3. MICs, transcription level of *mexY* and PA5471 and mutations in the *P. aeruginosa* clinical isolates and their corresponding $\Delta mexXY$ derivatives

Strains	MIC(breakpoint) ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}						Transcription level		Mutations		AMG-modifying enzyme
	AMK(64)	GEN(8)	KAN(8)	STR(64)	SPC(128)	TOB(8)	<i>mexY</i>	PA5471	<i>mexZ-mexX</i> ^{b,c)}	<i>rplY</i>	
PAO1	8	1.6	64	16	512	1	1	1	–	–	–
PA049	2	0.2	32	4	512	0.5					–
PAJ226	8	2	256	32	2,048	8	24	6	A(-112)-G	G-367-T(Ala-123-Ser)	<i>aadB</i> , <i>aac(3')-Ia</i> , <i>strAB</i>
PAJ262	0.5	<0.25	32	16	4	128	1				ND
PAJ227	2	4	8	4	64	2,048	4	191	16	–	–
PAJ264	0.25	1	2	0.5	16	256	0.5				–
PAJ229	8	4	256	128	128	1,024	2	4.7	1	–	<i>aadB</i> , <i>aac(3')-Ia</i>
PAJ266	1	0.5	64	8	8	128	0.5				ND
PAJ230	8	4	128	16	64	1,024	2	26	16	–	<i>aadA2</i> , <i>aac(3')-Ia</i>
PAJ268	1	0.5	32	4	4	256	0.25				ND
PAJ232	4	4	128	16	32	1,024	128	0.03	28	–	<i>aadA1</i> , <i>aadB</i> , <i>aac(3')-Ia</i>
PAJ270	2	1	64	8	32	256	16				ND
PAJ234	8	8	128	128	512	2,048	2	6	13	–	<i>aadB</i> , <i>aac(6')-IIa</i>
PAJ272	1	1	64	16	128	256	1				ND
PAJ239	8	2	128	8	128	1,024	1	21	2	–	–
PAJ274	2	0.5	64	0.5	8	256	0.5				–
PAJ240	16	8	256	128	2,048	4	3	1	A(-112)-G	–	–
PAJ277	2	ND	64	32	64	512	1				–
PAJ245	4	4	256	32	64	2,048	0.5	6	2	G-367-T(Ala-123-Ser)	<i>aadA2</i> , <i>aac(3')-Ia</i>
PAJ276	0.5	<0.25	64	8	8	128	0.25				ND
PAJ228 ^{d)}	4	256	128	8	512	1,024	256	6	12	C(-11)-G, G(-57)-A, A(-88)-T, G(-99)-T, G(-106)-C, A(-112)-G	<i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aac(3')-Ia</i> , <i>strAB</i>
PAJ233 ^{d)}	8	8	128	32	64	1,024	1	1	86	–	<i>aadB</i> , <i>aac(3')-Ia</i>
PAJ235 ^{d)}	16	128	256	16	512	1,024	4	8	19	G(-57)-A, A(-112)-G	<i>aadA2</i> , <i>strAB</i>
PAJ238 ^{d)}	8	4	128	32	512	1,024	1	21	1	A(-112)-G	–

Abbreviations and concentration ranges (in parenthesis): AMK, amikacin (1–2,048 $\mu\text{g/ml}$); GEN, gentamicin (1–256 $\mu\text{g/ml}$); KAN, kanamycin (1–2,048 $\mu\text{g/ml}$); NEO, neomycin (1–256 $\mu\text{g/ml}$); STR, streptomycin (1–2,048 $\mu\text{g/ml}$); SPC, spectinomycin (1–2,048 $\mu\text{g/ml}$); TOB, tobramycin (1–128 $\mu\text{g/ml}$). ND, not detected. a) Values in boldface indicate MICs for the parent strains that are at least 4-fold different from those for the corresponding $\Delta mexXY$ derivatives. b) *mexZ-mexX* intergenic region. c) Negative number indicates the positions of base pair changes relative to the first nucleotide of the *mexX* ATG start codon. d) Deletion of the *mexXY* operon was not successful.

zyme encoding genes were amplified using whole cell DNA templates.

Reverse transcription (RT)-PCR was performed to detect transcription of *mexY* and *nuoH*. Total RNA isolation of *P. aeruginosa* was carried out using Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen) and treated with RNase-free DNaseI (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.). One- μ g DNase treated RNA was reversed transcribed to single stranded-cDNA using ImProm-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, U.S.A.) with the reverse primers specific to *mexY* (i.e. *mexYRTdown*) and *nuoH* (i.e. *nuoHL823-L*) and then, the cDNA obtained was used as the template for PCR amplification using the specific primer pairs as described above.

For nucleotide sequencing analyses, the PCR products were purified using the QIAQuick Gel Extraction kit (Qiagen) and submitted for sequencing at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) using the PCR primers. The nucleotide sequence of each purified PCR product was determined on both strands, and the DNA-sequencing results were compared with PA2023 and PA2020 available at the *Pseudomonas* Genome Project (<http://pseudomonas.com>) for *galU* and *mexZ*, respectively [32].

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR): Transcription level of the *mexY* and PA5471 genes was assessed by qRT-PCR as previously described with some modifications [4, 14]. The cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA as described above and quantified using KAPA SYBR[®] FAST qPCR kit (Kapabiosystems). PCR assays were done in triplicates for all the genes. The Ct values from two separate experiments (SD<0.1) were used to estimate the average cDNA copy numbers for each sample, and the *rpsL* gene was used as internal control. The average *mexY* and PA5471 cDNA copy number was normalized with that of *rpsL*, and the transcription levels were identified as fold change-ratios to that of the reference strain PAO1.

RESULTS

Aminoglycoside susceptibility in *P. aeruginosa* isolates from canine and feline infections: All of the *P. aeruginosa* isolates were examined for their AMG susceptibility (Table 3). All exhibited resistance to spectinomycin and most isolates showed intermediate resistance to streptomycin, kanamycin and neomycin. Only few isolates were resistant to gentamicin (5 isolates) and tobramycin (3 isolates). None of the isolates were resistant to amikacin.

Effects of *mexXY* loss on AMG resistance: To further assess the participation of MexXY in AMG resistance in all isolates, the *mexXY* operon was deleted to generate unmarked $\Delta(mexXY)::FRT$ mutants and the impact on AMG resistance was evaluated. However, construction of unmarked $\Delta(mexXY)::FRT$ mutants was completed in only eight isolates. In addition, the Gm^r-FRT cassette was not successfully excised in one isolate (i.e., PAJ240), resulting in the $\Delta(mexXY)::Gm^r-FRT$ marked mutant (i.e., PAJ277) where the association of MexXY to gentamicin resistance was not assessed.

The effect of MexXY loss on AMG resistance varied

among the isolates in this collection. Deletion of *mexXY* resulted in 2- to 16 fold decline in AMG MICs in all nine isolates. Constitutive expression of MexXY from pAMR-1 fully restored the AMG susceptibilities, confirming the influence of $\Delta(mexXY)$ on all the AMG MICs observed (data not shown). The loss of *mexXY* reduced the MICs of all AMGs (4- to 16-fold) in three isolates (i.e., PAJ227, PAJ229 and PAJ230) and six of the seven AMGs in two isolates (i.e., PAJ226 and PAJ245). The absence of MexXY had only moderate effects (two- to fourfold decline in MIC) on AMG resistance in many strains. For example, the MICs for all AMGs tested of PAJ277 were only two- to fourfold reduced from those of the parents PAJ240. When consider individual AMG substrates, consequences of *mexXY* loss were different for the same substrate in different *P. aeruginosa* host strain. For instance, *mexXY* loss generated only a marginal effect on streptomycin susceptibility in two isolates (PAJ232 and PAJ240), but resulted in 16-fold decreased streptomycin MIC in three isolates (i.e., PAJ229, PAJ230 and PAJ239).

Quantitation of *mexXY* and PA5471: To evaluate the association between *mexXY* expression and AMG resistance, *mexXY* expression was initially measured by RT-PCR and their transcription was observed in all clinical isolates (data not shown). Then, the relative transcription level of *mexXY* was assessed. The Ct values of the *rpsL* internal control from different isolates were comparable with each other in all qRT-PCR experiments. The *mexXY* operon was found to overproduce three to 191-fold higher than PAO1 in 11 isolates. A decreased transcription of *mexXY* was detected in one isolate (i.e., PAJ232, 0.03 fold less than PAO1). The last isolate i.e., PAJ233 produced MexXY at the level equivalent to that of PAO1.

Relative expression of PA5471 was measured by qRT-PCR in all isolates. Of all the isolates tested, PA5471 was upregulated in 10 isolates, and its transcription level varied from 2- to 86-fold. The variability of PA5471 transcription level was observed among the isolates with comparable MexXY expression. For instance, PAJ234, PAJ228 and PAJ245 that expressed 6-fold MexXY produced PA5471 2- to 13-fold. Similarly, the strains with the similar PA5471 transcription level (i.e., PAJ227, PAJ230 and PAJ239) did not express MexXY at the same level. The strains with higher PA5471 expression produced neither higher *mexXY* transcriptional level nor higher AMG MICs than those with less PA5471 expression. This is best illustrated with PAJ233 that was not more resistant to AMGs than PAJ288 and PAJ235.

Sequencing analysis of *mexZ*, *rplY* and *galU*: The involvement of *mexZ* and the *mexZ-mexX* intergenic region in *mexXY* expression was examined by DNA sequencing in all isolates. The *mexZ* sequences in all the *P. aeruginosa* isolates tested were homologous to that of PAO1, while five isolates (i.e., PAJ226, PAJ240, PAJ228, PAJ235 and PAJ238) contained nucleotide changes in the *mexZ-mexX* intergenic region. A replacement of A at position -112 (relative to position 1 being the A of the *mexX* start codon) with G was most commonly found. Expression of MexXY in three isolates carrying only A (-112)G varied from three to 24-fold compared to PAO1. One isolate contained up to 6 single

base mutations (i.e., PAJ228), and its MexXY transcription level was comparable to that of the isolates carrying two single base mutations (i.e., PAJ235). The PAJ227 strain with highest MexXY transcription level contained no mutation within the *mexZ-mexX* intergenic region. Some isolates with the *mexZ-mexX* intergenic region indistinguishable from that of PAO1 (i.e., PAJ234 and PAJ245) had MexXY expression comparable to that of the strains carrying mutations in the region (i.e., PAJ228 and PAJ235).

The *galU* and *rplY* genes were sequenced in all isolates. The resulting DNA sequences showed that the nucleotide sequence of *galU* in all isolates was identical to that of PAO1. Only two isolates (i.e., PAJ226 and PAJ245) contained a G-367-T single point mutation in *rplY*, leading to an Ala-123-Ser amino acid substitution in RplY.

Expression of *nuoG*: Transcription of *nuoH* located downstream of *nuoG* was investigated by using RT-PCR in all isolates. Expression of *nuoH* was observed in all the isolates.

The presence of AMG-modifying enzyme encoding genes: Most isolates except PA227, PA238, PA239 and PA240 were positive to AMG-resistance genes tested (Table 3). Some strains carried several genes encoding resistance to an individual AMG e.g., PAJ228 and PAJ237. The genes most commonly identified were *aadB*(7 isolates) and *aac*(3')-Ia (7 isolates). None of the isolates were found to contain *aph*(3')-IIb, *ant*(2'')-Ia and *aac*(6')-IIb.

DISCUSSION

In the present study, the *P. aeruginosa* isolates from canine and feline infections were resistant to panaminoglycosides. High resistance rates to spectinomycin, streptomycin, kanamycin and neomycin were observed, in agreement with a previous study [20]. This may be not surprising, since these antibiotics are commonly prescribed in dogs and cats due to their relatively-less expensive cost. In contrast, lack of amikacin resistance and low resistance rates to gentamicin and tobramycin were observed. Both gentamicin and amikacin are antibiotics of last resort due to their common side effects of kidney damage and hearing loss. Similarly, tobramycin produces side effects and is not used long-term. This limited usage could be an explanation for such low resistance rates observed.

Diverse contribution of MexXY to AMG resistance among the dog and cat isolates in this study was similar to that previously reported in the *P. aeruginosa* veterinary isolates [4]. The loss of *mexXY* caused up to 4- to 16-fold reduction in MICs of several AMGs in many isolates, suggesting the significant contribution of the MexXY efflux pump in panaminoglycoside resistance. The moderate effects of *mexXY* loss on AMG resistance in several strains suggested the existence of other AMG-resistance determinants that were not characterized in this study. Such marginal effect of *mexXY* loss on resistance to clinically-important AMGs was previously observed in the cow isolates [4] and could create clinical impact by preventing AMGs from reaching their optimal concentrations, especially where the antibiotic penetration is impeded. Impact of MexXY loss on a single

AMG was different in different *P. aeruginosa* host strains. This is mostly due to the different combination of AMG-resistance mechanisms additionally expressed and compromised *mexXY* loss in each individual strain.

In addition, most isolates harbored AMG-modifying enzyme encoding genes confirming the existence of additional AMG-resistance mechanisms in the *P. aeruginosa* strains. However, the contribution level of these genes to AMG resistance is still unclear. Further investigations are required to disclose their significance level.

Expression of *mexXY* and its association with AMG resistance varied. The strains with the highest *mexXY* expression (i.e., PAJ227) did not show greater resistance to AMGs than those with much less *mexXY* expression (i.e., PAJ234, PAJ240, PAJ228, and PAJ235). The strain with a decreased transcription of *mexXY* was resistant up to four AMGs. Taken together, the data supported that *mexY* transcription was not associated with AMG resistance. This phenomenon was previously observed in the animal and human isolates [4, 25]. Therefore, high *mexXY* expression level is not an absolute marker for high AMG resistance level among the *P. aeruginosa* clinical isolates.

The predominant nucleotide change on MexZ, A(-112) G, was located outside of the MexZ-binding domain, but still situated in the predicted promoter of *mexX* located between positions -88 and -133 [4]. It was found that the presence and the number of single base mutations were not correlated to the MexXY transcription level, and the absence of mutation within the *mexZ-mexX* intergenic region did not guarantee the low MexXY transcription level. Based on the observations, it is unlikely that the mutations in the *mexZ-mexX* intergenic region have substantial impacts on MexZ functioning as a *mexXY* repressor.

The *P. aeruginosa* strains with comparable MexXY transcription level expressed PA5471 at different level (2- to 13 fold), and MexXY transcription level among the strains with comparable PA5471 transcription level was quite different. Therefore, there was a lack of good correlation between PA5471 expression level and *mexXY* transcription level. Two isolates i.e., PAJ233 and PAJ232 overexpressed PA5471 up to 86 and 28 fold, respectively, but did not overproduce MexXY, in agreement with a previous study in the CF isolates [14]. In *vice versa*, three isolates with PA5471 expression level comparable to that of PAO1 (i.e. PAJ229, PAJ240 and PAJ238) had elevated-MexXY expression (3- to 21-fold). These results suggest the existence of additional regulatory mechanisms that manipulate *mexXY* expression in the isolates. The strains with higher PA5471 expression produced neither higher *mexXY* transcriptional level nor higher AMG MICs than those with less PA5471 expression. This is best illustrated with PAJ233 that was not more resistant to AMGs than PAJ288 and PAJ235. Hence, the prominent PA5471 expression cannot be a conclusive indicator of high *mexXY* expression and high AMG resistance.

Sequencing analyses revealed the presence of single point mutation, A G-367-T, only in *rplY* from two isolates. This nucleotide change may have an impact on AMG resistance; however, its actual effect on AMG MICs was not investi-

gated in this study. Due to its location downstream of *nuoG*, expression of *nuoH* was examined to confirm the complete transcription of *nuoG*. Expression of *nuoH* was observed in all the isolates, indicating the *nuoG*-complete transcription and suggesting that the alteration of this gene did not play a role in AMG resistance among the veterinary strains in this study. Altogether, changes of *nuoG*, *rplY* and *galU* did not significantly contribute to AMG resistance level in the dog and cat isolates, similar to a previous observation in the human clinical isolates [14].

In conclusions, the results obtained in this study showed the contribution of the MexXY efflux pump in AMG resistance in the *P. aeruginosa* isolates from canine and feline infections. MexXY expression alone cannot explain the whole AMG resistance observed. The presence of MexXY-regulatory mechanisms additional to *mexZ* and PA5471 is suggested. The effects of *nuoG*, *rplY* and *galU* on AMG resistance were insignificant in AMG resistance of the *P. aeruginosa* dog and cat isolates. Further studies are warranted to elucidate the whole picture of MexXY-regulatory machinery in the AMG-resistant mutants in this study. Furthermore, the systematic surveillance of antimicrobial resistance that is usually performed in the pathogens from humans and live-stocks is required for those from companion animals. The prudent guideline for antimicrobial use should be elaborated for pet animals to prevent and control the emergence and dissemination of the multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Professor Dr. Herbert P. Schweizer, Colorado State University for strain providing. This work was supported by TRF-CHE Research Grant for Mid-Career University Faculty RMU5380035 co-funded by Thailand Research Fund, the Commission on Higher Education (CHE), Faculty of Veterinary Science, and Chulalongkorn University. KP is the recipient of the Royal Golden Jubilee Ph.D. program PHD/0014/2552, co-funded by TRF and Chulalongkorn University.

REFERENCES

1. Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R. and Schweizer, H. P. 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 428–432. [Medline] [CrossRef]
2. Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. and Schweizer, H. P. 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* **184**: 5036–5044. [Medline] [CrossRef]
3. Chuanchuen, R. and Padungtod, P. 2009. Antibiotic resistance genes in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 1349–1355. [CrossRef]
4. Chuanchuen, R., Wannaprasat, W., Ajariyakhajorn, K. and Schweizer, H. P. 2008. Role of the MexXY multidrug efflux pump in moderate aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from *Pseudomonas mastitis*. *Microbiol. Immunol.* **52**: 392–398. [Medline] [CrossRef]
5. CLSI. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M31-A2. CLSI, PA, U.S.A.
6. de Lorenzo, V. and Timmis, K. N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**: 386–405. [Medline] [CrossRef]
7. Dean, C. R. and Goldberg, J. B. 2002. *Pseudomonas aeruginosa galU* is required for a complete lipopolysaccharide core and repairs a secondary mutation in a PA103 (serogroup O11) *wbpM* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**: 277–283. [Medline] [CrossRef]
8. El’Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C. and Plesiat, P. 2007. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1016–1021. [Medline] [CrossRef]
9. Gatoria, I. S., Saini, N. S., Rai, T. S. and Dwivedi, P. N. 2006. Comparison of three techniques for the diagnosis of urinary tract infections in dogs with urolithiasis. *J. Small Anim. Pract.* **47**: 727–732. [Medline] [CrossRef]
10. Hariharan, H., Coles, M., Poole, D., Lund, L. and Page, R. 2006. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can. Vet. J.* **47**: 253–255. [Medline]
11. Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. and Schweizer, H. P. 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**: 77–86. [Medline] [CrossRef]
12. Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskaya, O. and Plesiat, P. 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1371–1375. [Medline] [CrossRef]
13. Islam, S., Jalal, S. and Wretling, B. 2004. Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**: 877–883. [Medline] [CrossRef]
14. Islam, S., Oh, H., Jalal, S., Karpati, F., Ciofu, O., Hoiby, N. and Wretling, B. 2009. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**: 60–66. [Medline] [CrossRef]
15. King, A. and Phillips, I. 1985. Pseudomonads and related bacteria. pp. 1–11. In: Identification and Characterization of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance (Collins, C. H. and Grange, J. M. eds.), Academic Press, New York.
16. Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. and Nishino, T. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 3322–3327. [Medline] [CrossRef]
17. Matsuo, Y., Eda, S., Gotoh, N., Yoshihara, E. and Nakae, T. 2004. MexZ-mediated regulation of *mexXY* multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the *mexZ-mexX* intergenic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**: 23–28. [Medline]
18. Mekic, S., Matanovic, K. and Seol, B. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Vet. Rec.* **169**: 125. [Medline] [CrossRef]

19. Pedersen, K., Pedersen, K., Jensen, H., Finster, K., Jensen, V. F. and Heuer, O. E. 2007. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**: 775–781. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
20. Petersen, A. D., Walker, R. D., Bowman, M. M., Schott, H. C. and Rosser, E. J. Jr. 2002. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992–1997). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **38**: 407–413. [[Medline](#)]
21. Poole, K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 479–487. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
22. Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 20–51. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
23. Rubin, J., Walker, R. D., Blickenstaff, K., Bodeis-Jones, S. and Zhao, S. 2008. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Vet. Microbiol.* **131**: 164–172. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
24. Schweizer, H. P. 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res.* **2**: 48–62. [[Medline](#)]
25. Sobel, M. L., McKay, G. A. and Poole, K. 2003. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 3202–3207. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
26. Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F. and Arrow, A. S. 1987. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* **51**: 439–457. [[Medline](#)]
27. Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O. and Lewis, K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 3133–3141. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
28. Vogne, C., Aires, J. R., Bailly, C., Hocquet, D. and Plesiat, P. 2004. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1676–1680. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
29. Watson, J. M. and Holloway, B. W. 1978. Chromosome mapping in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **133**: 1113–1125. [[Medline](#)]
30. West, S. E. H., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K. and Runyen-Janecky, L. J. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and the sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**: 81–86. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
31. Westbrook-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrenner, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R. and Stover, C. K. 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2975–2983. [[Medline](#)]
32. Winsor, G. L., Lam, D. K., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. and Brinkman, F. S. 2011. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* **39**: D596–D600. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
33. Wolter, D. J., Smith-Moland, E., Goering, R. V., Hanson, N. D. and Lister, P. D. 2004. Multidrug resistance associated with mexXY expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**: 43–50. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]
34. Yamamoto, M., Ueda, A., Kudo, M., Matsuo, Y., Fukushima, J., Nakae, T., Kaneko, T. and Ishigatsubo, Y. 2009. Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of mexXY in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **155**: 3312–3321. [[Medline](#)] [[CrossRef](#)]

Aminoglycoside resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from non-cystic fibrosis patients in Thailand

Kanchana Poonsuk, Chanwit Tribuddharat, and Rungtip Chuanchuen

Abstract: This study aimed to examine aminoglycosides (AMGs) resistance mechanisms, including the AMG-modifying enzyme genes, *mexXY*, *rplY*, *nuoG*, and *galU*, in the *Pseudomonas aeruginosa* non-cystic fibrosis (CF) isolates in Thailand. One hundred *P. aeruginosa* isolates from non-CF patients were examined for susceptibility to AMGs and for the presence of 10 AMG-modifying enzyme genes. Thirty randomly selected isolates were tested for transcription of *mexXY* and *nuoG* and mutations in *rplY* and *galU*. All the *P. aeruginosa* isolates exhibited simultaneous resistance to at least 4 AMGs. High resistance rates to amikacin (92%), gentamicin (95%), streptomycin (99%), and tobramycin (96%) were observed, and all isolates were resistant to kanamycin, neomycin, and spectinomycin. Nine AMG-modifying enzyme genes were detected, including *aadA1* (84%), *aadB* (84%), *aadA2* (67%), *ant(2'')-Ia* (72%), *strA-strB* (70%), *aph(3')-Ib* (57%), *aac(3')-Ia* (40%), and *aac(6')-IIa* (27%). None of the isolates harbored *aac(6')-Ib*. Of 30 isolates tested, all but 1 isolate expressed *MexXY*. Two isolates did not express *nuoG*. Six isolates carried an amino acid change in *RplY*, but none of the isolates harbored mutation in *galU*. The results indicated that the AMG-modifying enzyme genes were widespread among the *P. aeruginosa* non-CF isolates. The *MexXY* efflux pump and inactivation for *rplY* played a role in AMG resistance but disruption of *nuoG* or *galU* did not.

Key words: aminoglycoside-modifying enzymes, aminoglycoside resistance, *MexXY*, *Pseudomonas aeruginosa*, *rplY* gene.

Résumé : Cette étude visait à examiner les mécanismes de résistance aux aminoglycosides (AMG), notamment les gènes codant les enzymes de modification des AMG *mexXY*, *nuoG* et *galU*, dans des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* provenant de patients atteints de fibrose non-kystique en Thaïlande. La susceptibilité aux AMG et la présence de 10 enzymes de modification des AMG ont été examinées chez 100 isolats de *P. aeruginosa* provenant de patients atteints de fibrose non-kystique. La transcription de *mexXY* et *nuoG* de même que la présence de mutations à l'intérieur des gènes *rplY* et *galU* ont été étudiées dans 30 isolats choisis au hasard. Tous les isolats de *P. aeruginosa* présentaient une résistance simultanée à au moins 4 AMG. Des taux de résistance élevés à l'amikacine (92 %), à la gentamicine (95 %), à la streptomycine (99 %) et à la tobramycine (96 %) ont été observés, et tous les isolats étaient résistants à la kanamycine, à la néomycine et à la spectinomycine. Neuf gènes codant des enzymes de modification de l'AMG ont été détectés, dont *aadA1* (84 %), *aadB* (84 %), *aadA2* (67 %), *ant(2'')-Ia* (72 %), *strA-strB* (70 %), *aph(3')-Ib* (57 %), *aac(3')-Ia* (40 %) et *aac(6')-IIa* (27 %). Aucun des isolats ne possédait le gène *aac(6')-Ib*. Des 30 isolats testés, tous exprimaient *MexXY* sauf un. Deux isolats n'exprimaient pas *nuoG*. Six isolats comportaient un changement d'acide aminé à l'intérieur de *RplY* mais aucun isolat ne comportait de mutation sur *galU*. Les résultats indiquent que les gènes codant des enzymes de modification d'AMG étaient répandus parmi les isolats de *P. aeruginosa* non kystiques. La pompe d'efflux *MexXY* et l'inactivation de *rplY* jouaient un rôle dans la résistance aux AMG, contrairement à l'inactivation de *nuoG* et à *galU*. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : enzymes de modification d'aminoglycosides, résistance aux aminoglycosides, *MexXY*, *Pseudomonas aeruginosa*, gène *rplY*.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa represents the most frequent cause of lung infection in cystic fibrosis (CF) patients. CF is a genetic disease common within the Caucasian population (Pier 1998; Costerton 2001). While CF varies in prevalence among different racial and ethnic groups, the disease is rare in native Africans and Asians (Hamosh et al. 1998). Concurrently, the pathogen is the most well-known cause of hospital-acquired infections, particularly in immunocompromised and burn patients, worldwide including Thailand. *Pseudomonas aeruginosa* is notorious for resistance to various antibiotics and is considered the ultimate superbug. Several antibiotics are currently available for treatment of *P. aeruginosa* infections. Among these, aminoglycosides (AMGs) are potent bacteriocidal antibiotics that are a vital component for the antipseudomonal combinations and are mostly used in synergy with β -lactams. Two major drawbacks with AMG use include host toxicity

and bacterial resistance. Their nephro-, oto-, and audio-toxicities appear to be lessened by increasing dosing intervals and adjusting administration routes, e.g., aerosolization in lung infection (Turnidge 2003). However, resistance to AMGs has been increasing and become an important issue in *P. aeruginosa* therapy (Over et al. 2001; Kim et al. 2008; Vaziri et al. 2011).

Resistance to AMGs typically occurs via drug inactivation, impermeability, and active efflux pumps (Poole 2005). Among these mechanisms, the inactivation by plasmid- or chromosome-encoded modifying enzymes, traditionally including AMG phosphoryltransferase (APH), AMG acetyltransferase (AAC), and AMG nucleotidyltransferase (ANT), is the most predominant (Vakulenko and Mobashery 2003).

An individual *P. aeruginosa* can coharbor multiple modifying enzyme genes, resulting in the panaminoglycoside resistance phenotype (Vaziri et al. 2011).

Received 26 July 2012. Revision received 11 November 2012. Accepted 13 November 2012.

K. Poonsuk, Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

C. Tribuddharat, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

R. Chuanchuen, Department of Veterinary Public Health; Center for Antimicrobial Resistance Monitoring in Foodborne Pathogens (in cooperation with WHO); Global Foodborne Infections Network: South-East Asia and Western Pacific Region, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

Corresponding author: Rungtip Chuanchuen (e-mail: rchuanchuen@yahoo.com).



Table 1. Primers used in this study.

Gene	Primer	Sequence (5'–3')	Reference
<i>rplY</i>	rplYF144-U	ATCGCCCGAACGCTGGT	Islam et al. 2009
	rplYL902-L	ATGCCGGGTCTGCTCGTATTC	
<i>galU</i>	galUF140-U	CGAGCGCAGCCTGATTAGACT	Islam et al. 2009
	galUR1121-L	ACAGCTCAGGTAGGGCGGATA	
<i>mexY</i>	mexYRTUP	AGCTACAACATCCCCTA	Chuanchuen et al. 2008
<i>nuoH</i>	mexYRTdown	AGCACGTTGATCGAGAAG	Islam et al. 2009
	nuoHF657-U	GCAGGAACCTGGCGGACGG	
<i>aadA1</i>	nuoHL823-L	GGTCTTGGCGGCGAAGTAGAA	Chuanchuen and Padungtod 2009
	aadA1-F	CTCCGCAGTGGATGGCGG	
<i>aadA2</i>	aadA1-R	GATCTGCGCGCGAGGCCA	Chuanchuen and Padungtod 2009
	aadA2-F	CATTGAGCGCCATCTGGAAT	
<i>aadB</i>	aadA2-R	ACATTTGCTCATCGCCGCGC	Chuanchuen and Padungtod 2009
	aadB-F	CTAGCTGCGGCAGATGAGC	
<i>aac(3')-Ia</i>	aadB-R	CTCAGCCGCCTCTGGGCA	Chuanchuen et al. 2008
	aac3Iaup	CTGACCAAGTCAAATCCATGCGGG	
<i>aac(6')-IIa</i>	aac3Iadown	CCACTGCGGGATCGTCACCG	Chuanchuen et al. 2008
	aac6IIaup	AGAGCGATGGCGGAAGAGTCC	
<i>aac(6')-IIb</i>	aac6IIAdown	ATCCTGCCTTCTCATTGCAGCG	Chuanchuen et al. 2008
	aac6IIbup	CCGAAGAAGGAGTGACGCCG	
<i>aph(3')-IIb</i>	aac6IIbdown	GCGCAAACCGTTACCAACCG	Chuanchuen et al. 2008
	aph3IIbup	GAACGAAACCCAGAGCGACGG	
<i>ant(2'')-Ia</i>	aph3IIbdown	CAATCGATGAAGCCGCTGAAGC	Chuanchuen et al. 2008
	ant2Iaup	TGGAGCAGCAACGATGTTACGC	
<i>strA</i>	ant2Iadown	CCACTGGTGGTACTTCATCGG	Chuanchuen and Padungtod 2009
	strA-F	TGGCAGGAGGAACAGGAGG	
<i>strB</i>	strA-R	AGGTCGATCAGACCCGTGC	Chuanchuen and Padungtod 2009
	strB-F	GCGGACACCTTTTCCAGCCT	
	strB-R	TCCGCCATCTGTGCAATGCG	

In addition to enzymatic mechanisms, nonenzymatic AMG resistance mechanisms including the *mexXY* multidrug efflux system, *nuoG*, *rplY*, and *galU*, have been identified on the *P. aeruginosa* chromosome (El'Garch et al. 2007). Of 12 pseudomonal multidrug efflux pumps, the *MexXY-OprM* efflux pump is the only member of the Resistance-Nodulation-Cell division family that has been known to export AMGs (Aires et al. 1999; Masuda et al. 2000). The inactivation of 4 genes, including *nuoG*, *rplY*, and *galU*, gradually increases AMG resistance by reducing proton motif force, modifying the AMG target, and impairing AMG binding and uptake in the laboratory strain, respectively (Dean and Goldberg 2002).

Despite the problems, AMGs are still a pivotal antibiotic for treatment of a severe *P. aeruginosa* infection. Since the distribution of AMG resistance genes and other AMG resistance dynamically changes depending on different selection pressures and variation of strains, the study of resistance rate and relevant mechanisms is periodically required. AMG resistance mechanisms have been extensively studied in *P. aeruginosa* but mostly conducted in the CF isolates. This study aimed to determine the occurrence of AMG-modifying enzyme genes and the involvement of enzyme-independent mechanisms in AMG resistance in the non-CF *P. aeruginosa* isolates.

Materials and methods

Bacterial isolates

One hundred *P. aeruginosa* isolates were randomly selected from the stock of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. They originated from the respiratory tract (32%), the urogenital tract (21%), wound and pus (28%), and other sources (i.e., cerebrospinal fluid, catheter, and blood) (15%), from patients admitted to the hospital. The clinical samples were collected, as part of routine clinical practice, from patients initially receiving empirical treatment with β -lactam – AMG combinations (i.e., ceftaxidime/gentamicin and (or) imipenem/amikacin) and admitted to the hospital. All the samples were submitted for bacterial diagnosis and antimicrobial susceptibility testing for clinical treatment at Clinical Microbiology Lab-

oratory. One sample was obtained from each patient. The VITEK GNI card (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Missouri) and the API 20NE system (bioMérieux, Inc.) were used to identify all the isolates. A single isolate was collected from each positive sample that was the first sample from each patient and stored at –80 °C in 20% glycerol. The clonal relatedness of the isolates was not assessed.

Antimicrobial susceptibility testing

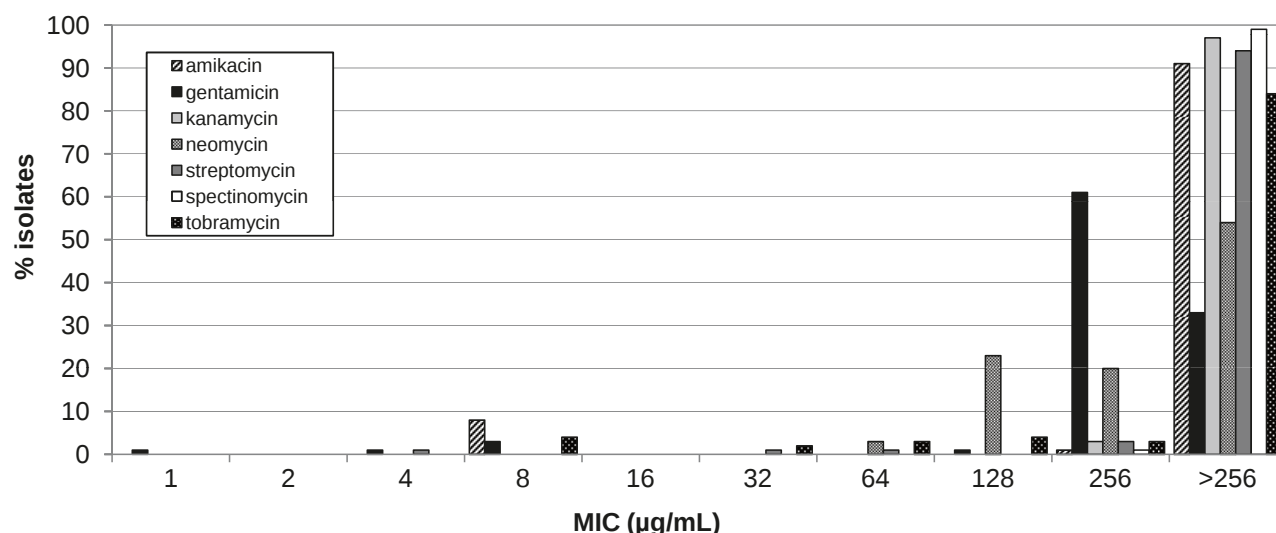
Antimicrobial susceptibilities to 7 AMGs, amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, and spectinomycin, were determined by using minimal inhibitory concentration (MIC) determination, as described in our previous study (Poonsuk et al. 2012). Susceptibility to tobramycin was additionally performed in this study using the 2-fold agar dilution method (CLSI 2008). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and PAO1 were used as control strains.

PCR, RT-PCR, and DNA sequencing

PCR template DNA were whole-cell boiled lysates prepared as previously described (Levesque et al. 1995). All PCR primers are listed in Table 1. PCR amplifications were performed using KAPA Taq ReadyMix (Kapa Biosystems Inc., Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instruction. The *rplY* and *galU* genes were amplified using the following primer pairs: rplY144-U–rplYL902-L and galUF140-U–galUR1121-L, respectively. All PCR products were purified from agarose gel using Nucleospin ExtractII (Mccherey-Nagel, Düren, Germany) and sent for nucleotide sequencing at MacroGen Inc. (Seoul, South Korea). The resulting DNA sequences for *galU* and *rplY* were compared, respectively, with that of PA2023 and PA4671, available from the *Pseudomonas* Genome Project (<http://pseudomonas.com>), respectively (Winsor et al. 2011).

The presence of 10 AMG-modifying enzyme-encoding genes were determined using PCR with the following primers: *aadA1*, *aadA1-F*–*aadA1-R*; *aadA2*, *aadA2-F*–*aadA2-R*; *aadB*, *aadB-F*–*aadB-R*; *aac(3')-Ia*, *aac3Iaup*–*aac3Iadown*; *aac(6')-IIa*, *aac6IIaup*–*aac6IIadown*;

Fig. 1. Distribution of minimal inhibitory concentration (MIC) of amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin, spectinomycin, and tobramycin for 100 *Pseudomonas aeruginosa* isolates.



aac(6')-IIb, *aac6IIbup-aac6IIbdown*; *aph(3')-IIb*, *aph3IIbup-aph3IIbdown*; *ant(2'')-Ia*, *ant2Iaup-ant2Iadown*; *strA*, *strA-F-strA-R*; and *strB*, *strB-F-strB-R*.

Total RNA was isolated using a Total RNA Extraction Mini kit (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan), and DNA contaminants were removed by treatment with RNase-free DNaseI (Fermentas, Ontario, Canada). cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, Wisconsin, USA) with the reverse primer *nuoHL823-L*. The conventional PCR were performed using *nuoHF657-U* and *nuoHL823-L* as described above.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Fisher's exact test in STATA software version 8.0 (STATA Corp., College Station, Texas, USA). A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. Odds ratios (OR) for significant associations were calculated. An OR of >1 represents positive associations and of <1 represents negative associations.

Results

Antimicrobial susceptibilities

All the *P. aeruginosa* isolates were simultaneously resistant to at least 4 AMG, while most exhibited high AMG resistance levels (Fig. 1). Eighty-six percent were resistant to all AMGs tested. One hundred percent of the isolates were resistant to kanamycin (MIC range: 256 – >256 μg/mL), neomycin (MIC range: 64 – >256), and spectinomycin (MIC range: 256 – >256). Resistance rates to amikacin, gentamicin, streptomycin, and tobramycin (MIC ranges: 8–2048, 1 – >256, 4 – >256, and 8 – >256 μg/mL, respectively) were 92%, 95%, 99%, and 96%, respectively.

The presence of AMG-modifying enzyme-encoding genes

All the *P. aeruginosa* strains were screened for 10 AMG-modifying enzyme-encoding genes (Table 2). All but 1 isolate were positive for at least 1 of the AMG resistance genes. Individual isolates carried multiple AMG-modifying enzyme-encoding genes, up to 9 genes. While most strains harbored *aadA1* (84%) and *aadB* (84%), none of them were positive for *aac(6')-IIb*. The *aadA2*, *ant(2'')-Ia*, and *strA-strB* genes were present at a similar rate, 67%, 72%, and 70%, respectively. The prevalence of the other AMG-modifying enzyme genes tested were as follows: *aph(3')-IIb* (57%), *aac(3')-Ia* (40%), and *aac(6')-IIa* (27%), respectively. The AMG-modifying enzyme-encoding genes were arranged in 53 patterns, of which the 2 most

common patterns were (i) *aac(3')-Ia*, *aph(3')-IIb*, *ant(2'')-Ia*, *aadB*, *aadA1*, *aadA2*, *strA-strB* (9%), and (ii) *aac(3')-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *aadB*, *aadA1*, *aadA2*, *strA-strB* (9%). In most cases, the presence of each resistance gene matched the resistance phenotype. However, strain PA190 (gentamicin MIC = 4 μg/mL) was positive for *aadB*, *ant(2'')-Ia*, and *aac(6')-IIa* and susceptible to gentamicin.

Expression of *mexY* and *nuoH*

Thirty *P. aeruginosa* isolates were randomly selected and tested for expression of *mexY* and *nuoH* (Table 3). All but 1 isolate expressed *MexY*. Transcription of *nuoH* was detected in 28 isolates. Both isolates without *nuoH* expression were resistant up to 6 AMGs.

Mutations in *rplY* and *galU*

The 30 *P. aeruginosa* isolates that were assessed for *mexY* and *nuoH* expression were further examined for the presence of mutations in *rplY* and *galU*. Nucleotide sequencing analysis revealed that 6 isolates were found to contain a single nucleotide change G367-T in *rplY*, leading to Ala-123-Ser in RplY. No mutations were found in *galU*.

Associations between resistance genes and phenotypes

When the associations between resistance genes and phenotypes were statistically analyzed, the strong positive associations (*P* < 0.05) were observed between *ant(2'')-Ia* and the gentamicin resistance phenotype (OR = 11.83) and between *aadA2* and the amikacin resistance phenotype (OR = 17.77). The associations between resistance genes were also tested. The positive associations (*P* < 0.05) were between gene pairs *aadB/aadA1* (OR = 6.40), *aadA1/aadA2* (OR = 4.42), *aadA2/strA-strB* (OR = 2.8), and *ant(2'')-Ia/strA-strB* (OR = 2.8). Only *aac(6')-IIa* exhibited negative association (*P* < 0.05) with *aadB* (OR = 0.29).

Discussion

The *P. aeruginosa* strains in this study exhibited multiresistance to AMGs, with high resistance level. Overall, AMG resistance rates in this study were higher than those in previous studies (Over et al. 2001; Kim et al. 2008; Vaziri et al. 2011). Such high resistance rate and level could be explained by prior exposure to AMGs in empirical combination therapy.

Most isolates exhibited a resistance phenotype consistent with AMG-modifying enzymes observed, suggesting the regular expression of the genes. Interestingly, strain PA190 (gentamicin MIC =

Table 2. Aminoglycoside (AMG)-modifying enzyme genes and resistance patterns in *Pseudomonas aeruginosa* (n = 100).

Gene (no. of isolates) ^a	Resistance phenotype (no. of isolates) ^b
<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aac(6')-IIa</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (3)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (3)
<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (9)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (9)
<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA-strB</i> (3)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (3)
<i>aac(3')-Ia</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (9)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (9)
<i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA-strB</i> (3)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (3)
<i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (5)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (5)
<i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> (3)	GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (1)
	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
<i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
<i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA-strB</i> (3)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (3)
<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
<i>ant(2')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (7)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (7)
<i>aac(3')-Ia</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
<i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (1)
	GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (1)
<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA-strB</i> (2)	KAN-NEO-STR-SPC (1)
	GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (1)
<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
<i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
<i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> (2)	GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (1)
	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (1)
<i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> (2)	AMK-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (1)
	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (1)
<i>aadB</i> , <i>aadA1</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)

^aOnly the patterns with at least 2 isolates are shown.^bAMK, amikacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; STR, streptomycin; SPC, spectinomycin; TOB, tobramycin.**Table 3.** Aminoglycoside (AMG) resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* (n = 30).

AMG resistance mechanism ^a				AMG-modifying enzyme-encoding gene		AMG resistance pattern
Group	<i>mexY</i>	<i>nuoH</i>	<i>rplY</i>	No. (%)	(no. of isolates) ^{b,c}	(no. of isolates) ^{b,d}
I	+	+	–	23 (76.7)	<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (3)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (3)
					<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (3)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (3)
					<i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (3)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (3)
					<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i>	GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA-strB</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> (3)	GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
						AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
					<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA-strB</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aac(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i>	GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aph(3')-IIb</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadB</i> (2)	AMK-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
II	+	+	Ala-123-Ser	5 (16.7)	<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i> (2)	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB (2)
					<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
					<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA-strB</i>	KAN-NEO-STR-SPC
					<i>aph(3')-IIb</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-SPC-TOB
III	+	–	–	1 (3.3)	<i>aac(6')-IIa</i> , <i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB
IV	–	–	Ala-123-Ser	1 (3.3)	<i>aph(3')-IIb</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA-strB</i>	AMK-GEN-KAN-NEO-STR-SPC-TOB

Note: AMK, amikacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; STR, streptomycin; SPC, spectinomycin; TOB, tobramycin.

^a+, expressed; –, not expressed.^bThe patterns represented by only 1 isolate are shown without a number.^cEach gene encodes AMG resistance as follows: *aadA1*, streptomycin and spectinomycin; *aadA2*, streptomycin and spectinomycin; *aadB*, gentamicin, kanamycin, and tobramycin; *aac(3')-Ia*, gentamicin; *aac(6')-IIa*, gentamicin and tobramycin; *aac(6')-IIb*, gentamicin and tobramycin; *aph(3')-IIb*, gentamicin, kanamycin and neomycin; and *ant(2'')-Ia*, gentamicin, kanamycin, and tobramycin.^dAMK, amikacin; GEN, gentamicin; KAN, kanamycin; NEO, neomycin; STR, streptomycin; SPC, spectinomycin; and TOB, tobramycin.

4 µg/mL) carried up to 3 gentamicin resistance encoding genes but was still susceptible to the antibiotic based on MIC determination. The exact reason for the sensitive phenotype of this strain is still unknown. However, similar observations were previously demonstrated in *Staphylococcus epidermidis* susceptible to oxacillin and (or) gentamicin (Martineau et al. 2000a) and *Staphylococcus aureus* susceptible to oxacillin and (or) erythromycin (Martineau et al. 2000b). A few explanations were suggested to explain these phenomena, including the regulation of gene expression, lack of host factors required for the phenotypic expression, and the borderline of MIC breakpoints (Martineau et al. 2000a, 2000b). In this study, *P. aeruginosa* isolates contained multiple AMG resistance genes, which is inconsistent with previous studies reporting that the majority of resistant isolates harbor only a single AMG-modifying gene (e.g., Miller et al. 1997). However, the findings could explain the panaminoglycoside resistance patterns of the strains in this collection. The most frequent resistance genes were *aadA1* (84%) and *aadB* (84%). Both *aadA1* and *aadB* genes are commonly found in foodborne pathogens, particularly *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* (Sunde and Norstrom 2006; Chuanchuen and Padungtod 2009), indicating their wide circulation among different bacterial species. The existence of identical genes in different bacterial hosts from different sources suggests their localization of transferable elements, e.g., plasmid, transposon. However, horizontal transfer was not tested in this study.

The *ant(2'')-I* and *aac(6')-II* genes represent the most common AMG-modifying enzyme genes in *P. aeruginosa* (Poole 2005; Vaziri et al. 2011). In this study, *ant(2'')-Ia* was detected at a high rate (72%) that is much higher than that reported in the USA and Europe (Miller et al. 1997). Of 2 *aac(6')-II* genes tested, only *aac(6')-IIa* gene was found (27%). The reason for such dominance remains unclear and may be associated with the type of AMGs used in the country. The *aac(6')-II* gene was prevalent in Iran (36%) (Vaziri et al. 2011) and Europe (32.5%) (Miller et al. 1997). Conversely, a Korean nationwide study showed the absence of *aac(6')-II* among the *P. aeruginosa* isolates (Kim et al. 2008). The variation was suggested to be a result of different types of AMGs used in different counties, difference in bacterial strains, and different geographical presence of AMG-modifying genes (Vaziri et al. 2011).

Statistical analyses revealed the strong positive associations between some resistance gene pairs. The possible explanation could be co-localization of the genes on the same genetic elements or the distribution of the same clonal isolates. However, genetic relatedness and plasmids were not analyzed in this study. Strong positive association of *ant(2'')-I* and gentamicin resistance phenotype was also observed, supporting its predominance in the *P. aeruginosa* clinical isolates. In contrast, *aac(6')-IIa* exhibited negative association with *aadB*. The latter may be explicated by an unstable existence of the genes on plasmids in the same incompatibility groups.

The varied impact of MexXY on AMG resistance has been previously demonstrated in the *P. aeruginosa* human and animal isolates (Sobel et al. 2003; Vogne et al. 2004; Chuanchuen et al. 2008). In this study, almost all of the isolates ($n = 29$) expressed MexY. This corresponds to a previous study showing that a high proportion of CF strains (17/20) overproduced MexXY, and the expression was associated with AMG resistance (Islam et al. 2009). Another study in the CF isolates also demonstrated a dramatic increase in MexXY production in the AMG-resistant strains (Vogne et al. 2004). However, the exact contribution and expression of MexXY was not assessed in the present study. The only strain without MexXY expression (Gr. IV) was resistant to all AMGs tested, indicating that MexXY may not participate in AMG resistance in this isolate. Vice versa, a substantial MexXY production was previously detected in an AMG-susceptible CF isolate (Vogne et al. 2004). Taken together, the data support that the MexXY efflux system does not always play a crucial role in AMG resistance in each individual *P. aeruginosa* clinical isolate and, its significance in AMG

resistance varies. The MexXY non-producer carried an Ala-123-Ser amino acid change in RplY and 3 modifying enzymes, i.e., *aph(3')-IIB*, *aadA2*, *strA-strB*, that are associated with its AMG resistance. However, these resistance determinants could not explain whole AMG resistance phenotypes of the strain, suggesting the presence of uncharacterized AMG resistance mechanisms.

The *nuoG* gene resides in the *nuoABDEFGHIJKLMN* operon, and its complete transcription was investigated by determination of *nuoH* transcription. The mRNA production of *nuoH* was not observed in 2 isolates (Gr. III and IV), which is in agreement with a previous study reporting that only 1 of 40 CF isolates had disrupted *nuoG* (Islam et al. 2009). While protonmotive force in these 2 strains may be damaged due to the disrupted *nuo* operon, 1 isolate expressed MexXY. In this case, the MexXY pumps in the latter may not fully function.

Six out of 30 strains (Gr. II and IV) carried an Ala-123-Ser amino acid substitution in RplY that has never been previously reported in the *P. aeruginosa* isolates. This observation disagreed with a previous report in the CF isolate, where no mutations were found in *rplY* (Islam et al. 2009). This variation may be attributed to the strain variation and difference in selection pressure generated by different AMG use.

No mutations were observed in *galU* in all examined isolates, which is in agreement with a previous study (Islam et al. 2009). Taken together, inactivation of *galU* is unlikely to play a role in AMG resistance in either the CF or non-CF *P. aeruginosa* isolates.

The unequal number of isolates used for screening AMG resistance genes ($n = 100$) and assessing the non-enzymatic AMG resistance mechanisms ($n = 30$) should be also noted. The observations in the latter may not represent the contribution of the same mechanisms in the isolates not tested. Even though the participation of *galU*, *nuoG*, and *rplY* in AMG resistance appeared insignificant, the impact of MexXY and AMG resistance genes may not be precisely compared in this study. *Pseudomonas aeruginosa* normally combines several mechanisms to become resistant to an antibiotic. While MexXY partly contributes to AMG resistance (Sobel et al. 2003; Chuanchuen et al. 2008) and synergizes the effect of AMG-modifying enzymes (Morita et al. 2012), its influence is variable in different strains. Owing to the existence of other as yet uncharacterized mechanisms, the contribution of each AMG resistance mechanism cannot be directly from resistance phenotypes or MIC values. Therefore, further investigations are required to evaluate the actual effect of these mechanisms to AMG susceptibility, e.g., determination of gene expression and deletion of individual genes by allelic exchange.

In conclusion, the AMG-modifying enzyme genes were widespread in the non-CF *P. aeruginosa* isolates. Of the isolates tested, most strains expressed MexXY. Two isolates did not produce the *nuoG* mRNA. Six carried an amino acid change in RplY, but none of the isolates harbored mutation in *galU*. Further studies are required to elucidate uncharacterized AMG resistance mechanisms in the *P. aeruginosa* non-CF isolates.

Acknowledgements

We thank Dr. Pawin Padungtod, US Centers of Disease Control Southeast Asia Regional Office, Bangkok, Thailand, for statistical analysis. This work was supported by the Research Grant for Mid-Career University Faculty RMU5380035, co-funded by the Thailand Research Fund (TRF), the Commission on Higher Education, the Faculty of Veterinary Science, and Chulalongkorn University. KP is the recipient of the Royal Golden Jubilee Ph.D. program PHD/0014/2552, co-funded by TRF and Chulalongkorn University.

References

- Aires, J.R., Koehler, T., Nikaido, H., and Plesiat, P. 1999. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2624–2628. PMID: 10543738.

- Chuanchuen, R., and Padungtod, P. 2009. Antibiotic resistance genes in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 1349–1355. PMID:19122404.
- Chuanchuen, R., Wannaprasat, W., Ajariyakhajorn, K., and Schweizer, H.P. 2008. Role of the MexXY multidrug efflux pump in moderate aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from *Pseudomonas mastitis*. *Microbiol. Immunol.* **52**: 392–398. doi:10.1111/j.1348-0421.2008.00051.x. PMID:18667038.
- CLSI. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighth informational supplement. CLSI document M100-S18. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Penn., USA.
- Costerton, J.W. 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infections. *Trends Microbiol.* **9**: 50–52. doi:10.1016/S0966-842X(00)01918-1. PMID:11173226.
- Dean, C.R., and Goldberg, J.B. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* galU is required for a complete lipopolysaccharide core and repairs a secondary mutation in a PA103 (serogroup O11) *wbpM* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**: 277–283. doi:10.1016/S0378-1097(02)00641-9. PMID:12044687.
- El'Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C., and Plesiat, P. 2007. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1016–1021. doi:10.1128/AAC.00704-06. PMID:17194835.
- Hamosh, A., FitzSimmons, S.C., Macek, M., Jr., Knowles, M.R., Rosenstein, B.J., and Cutting, G.R. 1998. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J. Pediatr.* **132**: 255–259. doi:10.1016/S0022-3476(98)70441-X. PMID:9506637.
- Islam, S., Oh, H., Jalal, S., Karpati, F., Ciofu, O., Hoiby, N., et al. 2009. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**: 60–66. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02097.x. PMID:19154484.
- Kim, J.Y., Park, Y.J., Kwon, H.J., Han, K., Kang, M.W., and Woo, G.J. 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 479–483. doi:10.1093/jac/dkn244. PMID:18606785.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C., and Roy, P.H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 185–191. doi:10.1128/AAC.39.1.185. PMID:7695304.
- Martineau, F., Picard, F.J., Grenier, L., Roy, P.H., Ouellette, M., and Bergeron, M.G. 2000a. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**: 527–534. doi:10.1093/jac/46.4.527. PMID:11020248.
- Martineau, F., Picard, F.J., Lansac, N., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., et al. 2000b. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 231–238. doi:10.1128/AAC.44.2.231-238.2000. PMID:10639342.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 3322–3327. doi:10.1128/AAC.44.12.3322-3327.2000. PMID:11083635.
- Miller, G.H., Sabatelli, F.J., Hare, R.S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., et al. 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanism — changes with time and geographic area: A reflection of aminoglycoside usage patterns? *Clin. Infect. Dis.* **24**(Suppl. 1): S46–S62. doi:10.1093/clinids/24.Supplement_1.S46. PMID:899479.
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y. 2012. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology*, **158**: 1071–1083. doi:10.1099/mic.0.054320-0. PMID:22282519.
- Over, U., Gur, D., Unal, S., and Miller, G.H. 2001. The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**: 470–478. doi:10.1046/j.1198-743x.2001.00284.x. PMID:11678929.
- Pier, G.B. 1998. *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. *ASM News*, **64**: 339–347.
- Poole, K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 479–487. doi:10.1128/AAC.49.2.479-487.2005. PMID:15673721.
- Poonsuk, K., Tribuddharat, C., and Chuanchuen, R. 2012. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical isolates. *Southeast. Asian J. Trop. Med. Public Health*, **43**: 376–384. PMID:23082590.
- Sobel, M.L., McKay, G.A., and Poole, K. 2003. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**(10): 3202–3207. doi:10.1128/AAC.47.10.3202-3207.2003. PMID:14506031.
- Sunde, M., and Norstrom, M. 2006. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 741–747. doi:10.1093/jac/dkl294. PMID:16931539.
- Turnidge, J. 2003. Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **17**: 503–528. doi:10.1016/S0891-5520(03)00057-6. PMID:14711074.
- Vakulenko, S.B., and Mobashery, S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 430–450. doi:10.1128/CMR.16.3.430-450.2003. PMID:12857776.
- Vaziri, F., Peerayeh, S.N., Nejad, Q.B., and Farhadian, A. 2011. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (*aac* (6')-I, *aac* (6')-II, *ant* (2')-I, *aph* (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics* (Sao Paulo), **66**: 1519–1522. PMID:22179152.
- Vogne, C., Aires, J.R., Bailly, C., Hocquet, D., and Plesiat, P. 2004. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 1676–1680. doi:10.1128/AAC.48.5.1676-1680.2004. PMID:15105120.
- Winsor, G.L., Lam, D.K., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M.D., Yu, N.Y., et al. 2011. *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Res.* **39**: D596–D600. doi:10.1093/nar/gkq869. PMID:20929876.