

**DETECTION OF METALLO-BETA-LACTAMASE
IN CEFTAZIDIME-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACILLI**

NUTTIYA INTACHANG

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

2003

ISBN 974-04-3294-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจหาเมตาโลเบต้าแลคเตมเมสในแกรมลบรูปแท่งที่คือเซฟแตสซิดิม (DETECTION OF METALLO-BETA-LACTAMASE IN CEFTAZIDIME-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACILLI).

ณัฐยา อินทร์ท่าฉาง 4336173 RACP/M

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : มาลัย วรจิตร, วท. ค. (พยาธิวิทยาคลินิก), อมรรัตน์ ลีลาภรณ์, Ph.D

บทคัดย่อ

ปัจจุบันพบเชื้อแกรมลบที่คือ อิมมิพิเนม โดยการสร้าง เมตาโลเบต้าแลคเตมเมสเพิ่มมากขึ้นทั่วโลก วิธี disk diffusion ซึ่งแนะนำโดย NCCLS ไม่เหมาะที่จะใช้ในการตรวจการคือยาระดับต่ำๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองที่มีความไวสูงกว่าในการตรวจหาเชื้อที่สร้าง เมตาโลเบต้าแลคเตมเมส วัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาวิธีมาตรฐานในการตรวจหา เมตาโลเบต้าแลคเตมเมส และศึกษาความชุกของการสร้าง เมตาโลเบต้าแลคเตมเมสในเชื้อแกรมลบรูปแท่งที่คือ เซฟแตสซิดิม โดยใช้วิธีคัดกรอง 2 วิธีคือ DDST ของ Arakawa และคณะและวิธีที่ประยุกต์ขึ้นคือ combination-disk โดยใช้ 2-MPA เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ และแผ่นยา CAZ แบ่งการศึกษาเป็น 3 ขั้นตอน โดยใน 2 ขั้นตอนแรกเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมของทั้งสองวิธีโดย ทดสอบกับเชื้อแกรมลบรูปแท่งที่คือ เซฟแตสซิดิม และ อิมมิพิเนม จำนวน 20 และ 103 เชื้อ ในขั้นตอนที่ 3 นำวิธีมาตรฐานทั้งสองมาตรวจหา เมตาโลเบต้าแลคเตมเมส ในเชื้อแกรมลบรูปแท่งที่คือ เซฟแตสซิดิม จำนวน 550 เชื้อ

พบว่าวิธี DDST ที่ใช้ 2-MPA 1 ไมโครลิตร และระยะห่างระหว่างแผ่นยาจากขอบถึงขอบเท่ากับ 1 ซม. ให้ผลบวกเป็นเปอร์เซ็นต์สูงที่สุดและให้ zone เบ้ที่ชัดเจนกว่าระยะห่างอื่นๆ สำหรับวิธี combination-disk เชื้อที่สร้าง เมตาโลเบต้าแลคเตมเมส จะให้ความแตกต่างระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางรอบแผ่นยา CAZ ที่มี 2-MPA 1 ไมโครลิตร และไม่มี 2-MPA ≥ 8 มม. ความถูกต้องของวิธี DDST และ combination-disk ในการคัดกรองเชื้อที่สร้าง เมตาโลเบต้าแลคเตมเมส ในเชื้อแกรมลบรูปแท่งที่คือ เซฟแตสซิดิม จำนวน 550 เชื้อ มีค่าสูงถึงร้อยละ 97.5 และพบว่าทั้ง 2 วิธี มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าวิธี DDST จะทำได้ง่าย ราคาถูกและสามารถใช้ตรวจหา เมตาโลเบต้าแลคเตมเมสในงานประจำวัน แต่พบว่ามีความยุ่งยากในการแปลผลจากความหลากหลายของ zone ที่เบ้ และนอกจากนี้ระยะห่างที่ไม่เหมาะสมก็ทำให้เกิดผลลบปลอมได้ วิธี combination-disk ไม่เกิดปัญหานี้และให้ผลที่ชัดเจนในการแปลผล แต่วิธีนี้ก็มีข้อจำกัด คือไม่สามารถตรวจหา VIM-1 และ VIM-2 ได้ และให้ผลบวกปลอมในเชื้อที่ไวต่อสาร 2-MPA แต่ผลบวกปลอมนี้ก็ไม่ได้ออกไปกว่าในวิธี DDST ดังนั้นวิธี combination-disk จึงเหมาะที่จะใช้ในการตรวจหา เมตาโลเบต้าแลคเตมเมสในงานประจำวัน ความชุกของการสร้าง เมตาโลเบต้าแลคเตมเมสในเชื้อแกรมลบรูปแท่งที่คือ เซฟแตสซิดิม ที่ศึกษา เท่ากับร้อยละ 8.7

DETECTION OF METALLO-BETA-LACTAMASE IN CEFTAZIDIME-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACILLI.

NUTTIYA INTACHANG 4336173 RACP/ M

M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORS: MALAI VORACHIT, D.Sc., AMORNRAT LEELAPORN, Ph. D.

ABSTRACT

Currently, metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli resistant to imipenem are increasing world-wide. The disk diffusion method recommended by NCCLS may not be appropriate for the detection of low-level ceftazidime-resistance. Therefore, a screening method with higher sensitivity should be developed for the detection of metallo-beta-lactamase producing strains. The aim of this study was to standardize a method for the detection of metallo-beta-lactamases and determine the prevalence of metallo-beta-lactamase producing ceftazidime-resistant gram-negative bacilli. We used two screening methods; DDST (Arakawa et al.) and modified the combination-disk test by using a 2-MPA inhibitor and CAZ disk. Three-parts testing of both the DDST and combination-disk test were performed. In the first two parts, the appropriate condition of both methods was determined in 20 and 103 IMP and CAZ-resistant gram-negative bacilli. In the last part, the two methods were used to determine metallo-beta-lactamases in 550 CAZ-resistant gram-negative bacilli.

The DDST, using 1 μ l of 2-MPA disk with 1 cm apart from edge to edge between the two disks, showed the highest positive percentage and was more clear cut than other distances. For the combination-disk test, the appropriate difference inhibition zone diameter surrounding the CAZ disk containing 1 μ l of 2-MPA and CAZ alone for metallo-beta-lactamase positive, was ≥ 8 mm. The accuracy of DDST and the combination-disk test for screening of the total 550 CAZ-resistant isolates was 97.5% and the statistical correlation was regarded as being significant. Although DDST was simple, inexpensive and able to be used for the detection of metallo-beta-lactamase in the routine laboratory, the method was highly subjective in the interpretation of results, with a great variation in the shape of the enhanced zone. Moreover, the inappropriate distance between the two disks may give a false-negative result. The combination-disk test has clear-cut criteria for positive and negative results and the distance between the two disks does not effect the results. This method cannot detect VIM-1 and VIM-2. False positives also occurred in the isolates that were susceptible to 2-MPA. However, the false positives in the combination-disk test were not higher than the DDST. Therefore, the combination-disk test is recommended for screening metallo-beta-lactamases in the routine laboratory. The prevalence of metallo-beta-lactamases was 8.7% in this study.

KEY WORDS: METALLO-BETA-LACTAMASE / GRAM-NEGATIVE BACILLI / CEFTAZIDIME

92 P. ISBN 974-04-3294-8