การเปรียบเทียบวิธีตรวจหาความไวรับต่อยา clarithromycin ของเชื้อ *Mycobacterium avium* complex

นางสาวนิฟารีดะห์ วาบา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6799-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF METHODS FOR SUSCEPTIBILITY TESTING OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX TO CLARITHROMYCIN RESISTANCE

Miss Nifaridah Waba

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-17-6799-4

Thesis Title	Comparison of Methods for Susceptibility Testing of *Mycobacterium avium* Complex to Clarithromycin Resistance
By	Nifaridah Waba
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph. D.
Thesis Co-advisor	Nibondh Udomsantisuk, M. Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

Thesis committee :

.....Chairman
(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. vet.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor
(Nibondh Udomsantisuk, M. Sc.)

.....Committee
(Charoen Chuchottaworn, M.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิฟารีดะห์ วาบา : การเปรียบเทียบวิธีตรวจหาความไวรับต่อยา clarithromycin ของเชื้อ *Mycobacterium avium* complex (COMPARISON OF METHODS FOR SUSCEPTIBILITY TESTING OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX TO CLARITHROMYCIN RESISTANCE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมหญิง ธัมวาสร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ นิพนธ์ อุดมสันติสุข, 95หน้า, ISBN974-17-6799-4

Mycobacterium avium complex (MAC) เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่สำคัญของมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี และการดื้อยา clarithromycin ของเชื้อ MAC ยังคงเป็นปัญหาที่ท้าทายในการรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ การทราบผลการทดสอบความไวรับมีประโยชน์อย่างยิ่งในการรักษาผู้ป่วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการที่มีความรวดเร็วและเชื่อถือได้ในการทดสอบความไวรับของเชื้อต่อยา ทำการเปรียบเทียบ BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson, U.S.A) และ Epsilometer test (E test; AB Biodisk, Solna, Sweden) ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบความไวรับวิธีใหม่กับวิธีที่ NCCLS แนะนำ คือ broth microdilution เพื่อใช้ในการทดสอบความไวรับของเชื้อ MAC ต่อยา clarithromycin ทำการศึกษาโดยนำเชื้อ MAC จำนวน 100 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างเลือดมาทำการทดสอบ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบของวิธี broth microdilution, BACTEC MGIT 960 และ E test คือ 15, 12 ถึง 14 (ค่ามัธยฐาน, 13) และ 13 วัน ตามลำดับ วิธีทดสอบทั้งสามวิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน 100% โดยเชื้อจำนวน 97 สายพันธุ์ (97%) ให้ผลไวต่อยา clarithromycin และเชื้อจำนวน 3 สายพันธุ์ (3%) ให้ผลดื้อต่อยา clarithromycin เมื่อทำการศึกษาความสอดคล้องกันของค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี E-test และ วิธี broth microdilution พบว่า 95% ให้ผลที่สอดคล้องกันภายใน ± 1 $\log_2$ dilution และเพิ่มสูงขึ้นเป็น 100% ภายใน ± 2 $\log_2$ dilution การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน domain V ของ 23S rRNA gene ของเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา (MIC>256μg/ml) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา clarithromycin เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง adenine 2058 (เลขลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *E. coli*) โดยจำนวน 1 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์เป็น A2058C และ จำนวน 2 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์เป็น A2058G

BACTEC MGIT 960 และ E test เป็นวิธีการทดสอบความไวรับที่มีความถูกต้องสำหรับการทดสอบความไวรับของเชื้อ MAC ต่อยา clarithromycin แต่อย่างไรก็ตาม วิธี BACTEC MGIT 960 มีราคาแพง ทำให้มีข้อจำกัดในการทดสอบได้เฉพาะที่ค่า cut-off MIC ของการดื้อยาเท่านั้น ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า E test เป็นวิธีการทดสอบความไวรับที่มีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางคลินิกแทนวิธี broth microdilution เนื่องจากเชื่อถือได้ ทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาไม่แพง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต นิฟารีดะห์ วาบา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4589098920 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD : *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX/ CLARITHROMYCIN RESISTANCE/ 23S rRNA GENE MUTATION SUSCEPTIBILITY METHODS

NIFARIDAH WABA : COMPARISON OF METHODS FOR SUSCEPTIBILITY TESTING OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX TO CLARITHROMYCIN RESISTANCE THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : NIBONDH UDOMSUNTISUK, M. Sc., 95 pp. ISBN 974-17-6799-4

Mycobacterium avium complex (MAC) has become a major human opportunistic pathogen, especially in HIV infected patients and resistance of MAC to clarithromycin remains a therapeutic challenge in these patients. Information of susceptibility testing result provides information for the management of MAC-infected patients. This requires a rapid and standardized method. The BACTEC MGIT 960 system (Becton Dickinson, U.S.A) and Epsilometer test (E test; AB Biodisk, Solna, Sweden), new susceptibility methods, were compared to NCCLS recommended method, broth microdilution, for the antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacetium avium* complex (MAC). One hundred MAC isolates from hemoculture were tested against clarithromycin. The turnaround time for identification of resistance was 15, 12 to 14 (median, 13), and 13 days for the broth microdilution method, BACTEC MGIT 960 and E test, respectively. One hundred percent agreement was demonstrated for all MAC clinical isolates, 97 isolates (97%) were susceptible and 3 isolates (3%) were resistant to clarithromycin. Agreement between the E test MICs and the broth microdilution MICs, within ±1 $\log_2$ dilution was 95% and within ±2 $\log_2$ dilution was increased to 100%. Nucleotide sequence of domain V of the 23S rRNA gene was determined in clarithromycin resistant isolates (MIC>256μg/ml). All of the 3 resistant isolates contained mutation of the domain V in 23S rRNA gene at position adenine (A) 2058 (cognate with *Escherichia coli* base). One isolate contained point mutation at position A2058C and 2 isolates contained point mutation at position A2058G.

The BACTEC MGIT 960 system and E test are accurate for determining susceptibility of MAC strains to clarithromycin. However, the high cost of BACTEC MGIT 960 system limited its use to only determine the cut-off MIC for resistance. This study concludes that the E test is a promising alternative to the broth microdilution in diagnostic mycobacteriology laboratory because it is reliable, easy, rapid and cost-effective.

Field of study Medical Microbiology
Academic year 2004

Student's signature Nifaridah Waba
Advisor's signature Somying Tumwasorn
Co- Advisor's signature Nibondh Udomsuntisuk

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible:

Associate Professor Dr. Somying Tumwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor for her excellent instruction, advice, in dispensable help, encouragement and criticism throughout the period of this study.

Instructor Nibondh Udomsantisuk, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for his kindness, advice, suggestion and assistance.

Associate Professor Dr. Somatat Wongsawang, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, the chairman of thesis committee and Dr. Charoen Chuchottaworn, the member of thesis committee for their constructive criticisms.

The Rachadapisek Sompoj research fund, Faculty of Medicine and the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study. The staffs of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their friendship and also special thank to Miss Anchalee La-ard for her kind help.

All the staffs of Mycobacteriology laboratory for their kind help in collecting the clinical isolates.

Finally, I am deeply indepted to my parents for their love, help, encouragement, understanding and support during of this study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II OBJECTIVE.....4

III LITERATURE REVIEW

MYCOBACTERIA.....5

GENERAL CHARACTERISTIC OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX.....9

EPIDEMIOLOGY.....10

CLINICAL MANIFESTATION.....12

TREATMENT OF MAC INFECTION.....13

PROPHYLAXIS OF MAC.....15

CLARITHROMYCIN.....16

MECHANISMS OF MACROLIDE RESISTANCE.....17

CLARITHROMYCIN RESISTANCE IN MAC.....20

METHOD FOR DETECTION OF CLARITHROMYCIN RESISTANCE IN MAC.....23

IV MATERIALS AND METHODS.....34

V RESULT.....41

VI DISCUSSION.....53

VII CONCLUSION.....57

CONTENT (CONTINUED)

Page

REFERENCE.....58
APPENDICES.....71
APPENDIX I.....72
APPENDIX II.....74
APPENDIX III.....76
APPENDIX IV.....78
BIOGRAPHY.....82

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	The species of mycobacteria	7
2.	Classification of NTM recovery from human based on principal site of involvement	8
3.	Mutation in the 23S rRNA gene detected association with macrolide resistance in MAC	22
4.	Number of clarithromycin susceptible and resistance isolates tested by broth microdilution	41
5.	Comparison of three susceptibility testing method for detection of clarithromycin resistance in 100 MAC isolates according to the broth microdilution interpretive breakpoints suggested by NCCLS	42
6.	MIC determined by broth microdilution and E test of 7 MAC isolates	43
7.	Comparison of the broth microdilution and E test for detection of clarithromycin resistance in 100 MAC isolates according in each interpretive breakpoints methods	43
8.	Agreement between E-test and broth microdilution MICs for clarithromycin tested against 100 MAC isolates	44
9.	MICs of clarithromycin for 100 MAC isolates by the broth microdilution method and E test	45
10.	Results of sequencing the domain V of 23S rRNA gene, and phenotypic determination	49

LIST OF FIGURES

Figure

Page

1. Diagrammatic section of the mycobacetrial cell wall.....5
2. Chemical structures of macrolide antibitotics.....16
3. Peptidyl transferase loop of 23S rRNA according to the model Noller.....21
4. Primer extension DNA polymerase extends a primer by using a complementary strand as a template.....28
5. Schematic diagram of PCR.....29
6. Principle of DNA-sequencing method developed by Sanger.....31
7. Chromatogram of sequencing by automate sequencer.....32
8. Principle of PCR-nonisotopic RNase cleavage assay.....33
9. Clarithromycin MIC determination of clarithromycin susceptible MAC isolate with the E test method.....46
10. Amplification of MAC DNA.....47
11. Nucleotide sequence of the 420 bp amplicon from 23S rRNA gene from MAC-susceptible isolate.....50
12. Nucleotide sequence of the 420 bp amplicon from 23S rRNA gene from MAC-resistance isolate (A2058G) 51
13. Nucleotide sequence of the 420 bp amplicon from 23S rRNA gene from MAC-resistance isolate (A2058C) 52

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A	adenosine
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
AZM	azithromycin
bp	base pair
C	cytidine
CO_2	carbon dioxide
Clr	clarithromycin
^oC	degree celsius
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
ddATP	dideoxyadenosine 5'-triphosphate
ddCTP	dideoxycytidine 5'-triphosphate
ddGTP	dideoxyguanosine 5'-triphosphate
ddTTP	dideoxytymidine 5'-triphosphate
DDW	double distilled water
ddNTPs	dideonucleotide-tri-phosphate
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
DNA	deoxynucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide-tri-phosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
DW	distilled water
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
et al.	et alii
E test	epsilometer test
FDA	fluorescein diacetate
g	gram
G	guanosine
HCl	hydrochloric acid
HIV	human immunodeficiency virus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION (CONTINUED)

HPLC	high performance liquid chromatography
hr	hour
i.e.	id test
M	molar
MAC	*Mycobacterium avium* complex
MGIT	mycobacterial growth indicator tube
MOTT	*Mycobacterium* Other Than Tubercle
MTB	*Mycobacterium tuberculosis*
M.	*Mycobacterium*
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride
MIC	minimal inhibitory concentration
min	minute(s)
ml	milliliter
mM	millimolar
mmol	millimolar
NaCl	sodium chloride
Na_2HPO_4	sodium phosphate dibasic, anhydrous
NaOH	sodium hydroxide
NCCLS	national committee for clinical laboratory standards
NTM	non-tuberculous mycobacteria
OADC	oleic acid-albumin-dextrose-catalase
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomol
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
16S rRNA	sixteen subunit ribonucleic acid
23S rRNA	twenty three subunit ribonucleic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION (CONTINUED)

sec	second
T	thymidine
TAE	tris-acetate-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethane
U	unit
µg	microgram e
µl	microliter
µM	micromolar
UV	ultraviolet
V	volt
ZN	Ziehl-Neelsen

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย