กลไกการดื้อยาใน *Candida albicans* ที่ดื้อยา Fluconazole

นางสาวศิรดา ขาวเจริญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546
ISBN 947-17-5575-9
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RESISTANT MECHANISMS IN FLUCONAZOLE RESISTANT *CANDIDA ALBICANS*

Miss Sirada Kaocharoen

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Departmental)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-5575-9

Thesis Title	RESISTANT MECHANISMS OF FLUCONAZOLE RESISTANT *CANDIDA ALBICANS*
By	Miss Sirada Kaocharoen
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Tanapat Palaga, Ph.D.

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

..... Dean of The Graduate School
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

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

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Tanapat Palaga, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Patama Leewanich, Ph.D.)

ศิรดา ขาวเจริญ: กลไกการดื้อยาใน *Candida albicans* ที่ดื้อยา fluconazole (RESISTANT MECHANISMS IN FLUCONAZOLE RESISTANT *CANDIDA ALBICANS*) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.อริยา จินดามพร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ, 70 หน้า, ISBN 947-17-5575-9

งานวิจัยเป็นการศึกษากลไกการดื้อยา fluconazole ของ *Candida albicans* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา fluconazole ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของยาเท่ากับ 8 16 24 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดลองนี้เริ่มต้นด้วยจากเซลล์เดี่ยวในการทดลองและทดลอง 5 ซ้ำ ซึ่งสูงกว่าค่า minimum inhibition concentration (MIC) เดิมที่วัดได้ก่อนการเพาะเลี้ยง คือ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยวิธีการ E test และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธีการ microdilution test การเหนี่ยวนำให้เกิดการดื้อยาจะทำต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ที่เตรียมใหม่ที่มีความ เข้มข้นของยาคงที่เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยเชื้อที่ใช้จะมีปริมาณเท่ากันทุกครั้งและมีปริมาตรทั้ง สิ้นรวมเป็น 5 มิลลิลิตร การศึกษานี้จะทำการวัดหาค่า MIC ศึกษาลำดับเบสของยีน *ERG11* และ การทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา *CDR1 CDR2 MDR1* และ *EGR11* จากเชื้อ ณ 5 ช่วง ระยะเวลาเมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 0 14 29 50 และ 60 วัน

ผลการศึกษาพบว่า ค่า MIC เพิ่มขึ้นจากค่าเดิมเป็น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเชื้อทุกกลุ่มที่ทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาในวันที่ 14 จนถึงวันที่ 60 ของการศึกษา ส่วนค่า MIC ของเชื้อในอาหาร ที่ไม่มียามีค่าเท่าเดิมหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงจนถึงวันที่ 60 เป็นที่น่าสนใจว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยยาค่า MIC ของเชื้อสองสายพันธุ์ในวันที่ 29 เพิ่มขึ้นเป็น 64 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตรแล้วลดลงเป็น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 50 *C. albicans* ในกลุ่มอื่นๆค่า MIC ไม่มีการเปลี่ยนแปลง *C. albicans* สายพันธุ์ที่ 22และ 23 มีค่า MIC เป็น 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและคงที่จนถึงวันที่ 60 ในการศึกษาลำดับเบสของยีน *ERG11* และการแสดงออกของทั้ง 4 putative genes ของเชื้อทั้ง 5 ช่วงเวลาของการเก็บเชื้อที่มีค่า MIC เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงที่ทำ การเก็บเชื้อพบการเกิด silent mutation ของยีน *ERG 11* คือไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับของกรดอะมิโน แสดงว่า *ERG11* ไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเชื้อที่ศึกษา ส่วนการแสดงออกของ putative genes พบว่าทั้ง *CDR1 CDR2 MDR1* และ*EGR11* มีการแสดงออกในทุกสายพันธุ์ของเชื้อที่ทำการศึกษา ยกเว้น *CDR2* ที่ไม่พบการแสดงออกในกลุ่มเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา fluconazole ทุกช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา

สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา) ลายมือชื่อนิสิต.....ศิรดา ขาวเจริญ.....

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อริยา จินดามพร.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....ธนาภัทร ปาลกะ.....

##4489106120 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD : *CANDIDA* / *CANDIDA ALBICANS* / FLUCONAZOLE/ RESISTANT / RESISTANT MECHANISMS
SIRADA KAOCHAROEN: RESISTANT MECHANISMS IN FLUCONAZOLE RESISTANT *CANDIDA ALBICANS*: THESIS ADVISOR: ASSOCIAE PROFESSOR ARIYA CHINDAMPORN, Ph.D., THESIS CO – ADVISOR: TANAPAT PALAGA, Ph.D. 69 pp. ISBN 974-17-5575-9.

The purpose of this study was to investigate the evolution of fluconazole resistant in susceptible *C.albicans* under the condition of high drug concentrations. Four difference higher concentrations, 8, 16, 24 and 32 μg/ml, than its original MIC (8 μg/ml by Etest and 2 μg/ml by broth microdilution test) were prepared to induced each single yeast cell. Five repeats were tested in each concentration. The continuous induction with the same concentration for 60-day period was performed by changing fresh medium, RPMI-1640 broth, with the same drug concentration everyday and then inoculating the certain amount of the previous day's culture to obtain 5 ml. To reveal the objective of this study, MICs, hot spot of *ERG11* gene, and expression of four putative gene *CDR1, CDR2, MDR* and *ERG11*, of the cultures at day 0, 14, 29, 50 and 60 were determined. Regarding the MICs result, it was found that the increasing level of MIC from its original level to 32 μg/ml was demonstrated in all fluconazole induced cultures at day 14 through day 60 whereas the MIC of the all cultures from free-fluconazole broth remianed the same through day 60. It is of interested that the MIC of two cultures from day 29 was to 64 μg/ml and down to 32 μg/ml in day 50. *C.albicans* in other remain group MIC were not changed. *C.albicans* strain 22 and 23 showed MIC increased to 64 μg/ml and stable until day 60. To determine the base sequences of *ERG 11* and the expression of the four putative genes, the cultures at all the 5 time-points of any cultures which demonstrated the changing of MIC at any time point were recruited. Although the resistant induction was revealed by the increasing of the MICs, only silent position or no amino acid change was found in the hot spot area. The study of base sequence showed that this gene was not involved in fluconazole resistant mechanism because amino acid were not changed. The putative resistant gene *CDR1, CDR2,MDR1* and *ERG11* were expressed in all tested strain except *CDR2* was not detected in the drug absence media groups from all time point of study.

Field of Study Medical Microbiology
Academic year 2003

Student's signature Sirada Kaocharoen
Advisor's signature Ariya Chindamporn
Co – advisor's signature Tanapat Palaga

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to best my extreme gradtitude and appreciation to Associate Professor Dr. Ariya Chindamporn, my major advisor, for accepting me as a student and giving me an opportunity to develop not only the scientific parts of my personality but also social parts which will be very useful in the future. Her kind supervision, expert guidance and encoragement enable me to accomplish this thesis.

My appreciation is also express to Dr. Tanapat Palaga, my co-advisor, for his valuable advice and idea and give me an opportunity to work on this reserch. I also indebted to Assistant Professor Dr. Pathama Leewanich, my external committee, for her valuable advice and comments to make my thesis complete.

I wolud like to thanks Mr. Boonchuy Empokalarp, Dr. Jaturong Puttiporn for all the supports of equipments and drug. Morethan that, I also would like to thanks thanks to Miss Pumjit Yumyaun, Miss Patcharee Kammarnjessadakul, Mr. Wichit Taweekarn and all staff members of Mycology Unit, Department of Microbilogy of Faculty of Medicine, for their assistant supports, making good kindness and friendships.

My sincere thanks are extended to all of my friends, espacially Miss Sasiporn Rungdachsuwan and Miss Piyamas Jinnopat for their helpful , friendship and adoration.

Finally, I wish to express my deepest appreciation and thankfulness to my mother and my sister, for their love, their understanding and supports. All of my success belongs to them.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....ix

ABBREVIATION.....x

CHAPTER I INTRODUCTION.....1

II OBJECTIVES.....4

III REVIEW LITERATURE.....5

IV MATERIALS AND METHODS.....28

V RESULTS.....41

VI DISSCUSSIONS.....52

REFERENCES.....54

APPENDICES.....61

BIOGRAPHY.....70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1 : The risk factor of drug resistant in organism.....15
2 : Antifungal agent : activities against principal modes of action and resistance mechanism of fungal pathogen.....27
3. : Drug were treat in recruited patients.....28
4. : Preparing of experiment for fluconazole induction test.....35
5. : Minimal inhibition concentration (MIC) against isolates of *C. albicans* clinical isolated from oral lesion of 6 HIV - infected patients in this research.....41
6. : The fluconazole MIC lavel (μg/ml) of experimental *C. albicans* detected by microdilution test.....43
7. : The expression of *CRD1, CDR2, MDR1* and *ERG11* mRNA for each group at each time point..... 49
8. : Summarize the expression of *CRD1, CDR2, MDR1* and *ERG11* mRNA for each cultures group.....51

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1 : The structure of azole antifungal agent.....7
2 : The action of fluconazole to fungal target enzymes, Cytochrome P-450 dependent 14α - sterol demethylase cause to membrane impair function.....9
3 : The structure of polyene antifungal agent.....9
4 : The structure of allylamines antifungal agent.....10
5 : The structure of flucytosine agent.....12
6 : The azole resistant mechanism.....21
7. : Demonstrated the tools of single cell isolation.....29
8. : Demonstrate the single cell isolation method.....30
9. : Preparation of microdilution plate.....33
10. : The pattern of MIC level of experimental *C.albicans* at day 14 (group 1 was cultured in drug free medium, group 2 – 5 were cultured in drug presence media at concentration 8, 16, 24 and 32 μg/ml, respectively.).....44
11 : The pattern of MIC level of experimental *C.albicans* strain 11 and 18.....45
12. : The patterns of MIC level of experimental *C.albicans* strain 22 and 23. The MIC was measured at each interval time of culture.....46
13. : The point mutation at position 315 of *C. albicans* K 44.1.....47
14. The expreesion of mRNA of original *C. albicans* K44.1.....48

ABBREVIATIONS

α	=	alpha
° C	=	degree celsius
μg	=	microgram
μl	=	microliter
AIDS	=	acquired immunodeficiency syndrome
C.	=	*Candida*
CDR	=	*Candida* Drug Resistant
DNA	=	deoxy nucleic Acid
DW	=	distilled water
ERG	=	P450-14alpha demethylase
et al.	=	et alii
h	=	hour
kb	=	kilobase
g	=	gram
M	=	molar
MDR	=	Multi-Drug Resistant
mg	=	milligram
MIC	=	minimal inhibition concentration
min	=	minute
ml	=	milliliter
ng	=	nanogram

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS (continued)

rotor	=	rotor per minute
RNA	=	ribodeoxy nucleic acid
S. cerevisiae	=	*Saccharomyces cerevisiae*
SDB	=	Sabouraud dextrose broth
Sec	=	second
Taq	=	Taq polymerase
U	=	unit
USA	=	United State of America

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย