

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

กลไกการดื้อยาใน *Candida albicans* ต่อ fluconazole

โดย

ผู้ศาสตราจารย์ ดร.ชนาภัทร ปาลกะ หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินดามพร ผู้ร่วมโครงการ

สถาบันวิทยบริการ

เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2550

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความสนับสนุนเงินทุนสำหรับงานวิจัยของกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ สำหรับการสนับสนุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวิจิต ทวีกาญจน์ คุณศิริดา ขาวเจริญ คุณพัชรี กัมมารเจษฎากุล คุณพรรติพา พรตเจริญ คุณภูมิจิตร ย้ายวน และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ ให้การสนับสนุน และช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย กลไกการดื้อยาใน *Candida albicans* ต่อ fluconazole
ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนกภัทร ปาลกะ
รองศาสตราจารย์ ดร.อริยา จินตามพร
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ พฤษภาคม ค.ศ. 2007

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการใช้ยาในกลุ่ม azole เพื่อรักษาโรคติดเชื้อยีสต์เป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลาย และรายงานเชื้อ *Candida* ดื้อต่อยา fluconazole ในยาในกลุ่ม azole มีเพิ่มขึ้น เชื้อ *Candida* เหล่านี้มักแยกจากผู้ป่วยเอดส์ ซึ่งมักมีประวัติการใช้ยา fluconazole ในที่นี้ คณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ศึกษากลไกการดื้อยา fluconazole ในระดับโมเลกุลใน *Candida* สายพันธุ์ที่แยกได้จากรอยโรคในช่องปากของผู้ป่วยเอดส์และมีความไวรับต่อยา fluconazole (Minimum inhibitory concentration, MIC = 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในหลอดทดลอง ด้วยการกระตุ้นในสภาวะที่มีความเข้มข้นยาที่สูง จากนั้นศึกษาในระดับโมเลกุล การกระตุ้นในหลอดทดลองโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อเซลล์เดี่ยวจากสายพันธุ์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI ที่มียา fluconazole ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 8 16 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่ม 2 – 5 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 60 วัน และหาค่า MIC ของเชื้อในวันที่ 0 15 30 และ 60 หลังจากการกระตุ้น ด้วยวิธี Microdilution broth อิงมาตรฐาน CLSI M 27-A ผลการศึกษาพบว่า หลังการกระตุ้นแล้ว 15 วัน เชื้อทุกกลุ่มที่ถูกกระตุ้น (inducible strain) มีค่า MIC เพิ่มขึ้นจาก 2 เป็น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และหลัง 50 วัน พบว่า ร้อยละ 40 ของเชื้อในกลุ่ม 5 เท่านั้น ที่มีค่า MIC สูงขึ้นถึง 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ค่า MIC ที่เพิ่มขึ้นนี้มีความเสถียรอย่างน้อย 30 วัน ต่อมาได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *ERG11* ของ inducible strain ที่มีค่า MIC เพิ่มขึ้น โดยวิธี PCR พบลำดับเบสไม่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์เดิมที่มีความไวรับต่อยา และเมื่อเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนก็ให้ผลเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามทั้งลำดับเบสของเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ดื้อต่อยา โดยมีความแตกต่างกัน 1 เบสที่ตำแหน่งที่สอง (จาก TCA ไปเป็น TTA) ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Leucine เป็น Serine ที่ตำแหน่ง 421 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ putative gene ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม azole คือ *MDR1* *CDR1* *CDR2* และ *TAC1* (*CDR1* และ *CDR2* transcriptional gene) ใน inducing strain ที่มีค่า MIC เพิ่มขึ้นหลังจากการกระตุ้นแล้ว 30 และ 50 วัน โดยวิธี Reverse Transcriptase PCR (RT – PCR) ผลการศึกษาพบการแสดงออกของยีน *MDR1* *CDR1* *CDR2* และ *TAC1* แต่การแสดงออกนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมที่ไวรับต่อยา

Project Title **Fluconazole Resistant Mechanisms in *Candida albicans*.**

Name of the Investigators **Assoc. Prof. Tanapat Palaka, Ph.D.**
Assoc.Prof. Ariya Chindamporn, Ph.D.

Year **May 2007**

Abstract

Nowadays, the azoles group has been widely used for yeast infection treatment. Also, the reports of resistance *Candida* against fluconazole have increasing and these yeasts were commonly isolated from AIDS persons whom were treated with fluconazole. Here we focused on the *in vitro* molecular mechanisms of fluconazole resistance in susceptible clinical *Candida albicans* isolate from oral lesion (Minimum inhibitory concentration, MIC = 2 µg/ml) by treated each single cell from the susceptible wild type isolate in RPMI-1640 broth containing of 8, 16, 32, and 64 µg/ml fluconazole, final concentration, (group 2-5, respectively) for 60 days. Then, their MICs at day 0, 15, 30, 50, and 60 were investigated using standard procedure CLSI-M27A. The result showed that the MIC of all the inducible strains after 15 days increased from 2 to 32 µg/ml whereas that of 40% of group 5, after 50 days, rose to 64 µg/ml. The stability of these increasing values remained until at least 30 days. Later, Sequence analyses of *ERG11* of those increasing MIC strains were performed by PCR. No difference between those and wild type was observed so as their amino acids. However, one base difference between inducible strain and the resistance wild type isolate (TCA to TTA) was detected, resulting L421S amino acid alteration which has not yet been reported. In addition, expression of putative genes involved in azoles resistance, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2*, and *TAC1* (transcriptional of *CDR1* and *CDR2*) of MIC raising strains at day 30 and day 50 was investigated by Reverse Transcriptase PCR (RT – PCR). It was shown that the expression of all these putative genes was observed with no significance difference to the either susceptible wild type or resistance wild type isolate.

สารบัญ (Table of Content)

ลำดับที่		หน้า
1	กิตติกรรมประกาศ	ii
2	บทคัดย่อภาษาไทย	iii
3	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
4	สารบัญ	v
5	รายการตารางประกอบ	vi
6	รายการภาพประกอบ	vii
7	บทนำ	1
8	การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
9	วัตถุประสงค์	17
10	วิธีการวิจัย	18
10	ผลการวิจัย	29
11	อภิปรายผลและข้อสรุป	40
12	ข้อเสนอแนะ	42
13	ส่วนอ้างอิง	43
14	ส่วนผนวก	48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ (List of Tables)

ลำดับที่		หน้า
1	ปัจจัยที่ทำให้เกิด clinical antifungal drug resistance	9
2	แสดงเชื้อ <i>C. albicans</i> จำนวน 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากรอยโรคในช่องปากผู้ป่วยเอดส์ที่เป็นโรค Oropharyngeal candidiasis จำนวน 6 ราย และผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อรา	19
3	แสดงผลการเตรียมความเข้มข้นของยา fluconazole เป็น ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (มก./มล.) ในการกระตุ้นเชื้อ <i>C. albicans</i> (0.5 McFarland) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RPMI 1640	21
4	รายชื่อ primer ที่ใช้ในการทำ PCR	27
5	รายชื่อ primer ที่ใช้ในการทำ <i>ERG11</i> Sequencing	28
6	ค่า MIC ของ <i>C. albicans</i> ที่แยกได้จากช่องปากผู้ป่วยติดเชื้อ HIV เมื่อศึกษาด้วยวิธี Etest	30
7	แสดงค่า MIC ของเชื้อในกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) และกลุ่มทดลอง (กลุ่มที่ 2 – 5) ที่กระตุ้นด้วยยา fluconazole	32
8	แสดง point mutation ของยีน <i>ERG11</i> ในเชื้อแต่ละตัว	34
9	แสดงการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่เกิดจาก point mutation ของยีน <i>ERG 11</i>	35
10	แสดงค่าความเข้มของ band (PCR product) ของยีน <i>MDR1 TAC1 CDR1</i> และ <i>CDR2</i> จากการใส่ template cDNA ที่มีความเข้มข้นเท่ากันในการทำปฏิกิริยา PCR	39

รายการภาพประกอบ (List of Figures)

ลำดับที่		หน้า
1	ผังแสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาต้านเชื้อราชนิดต่างๆ ในเซลล์เชื้อรา	4
2	โครงสร้างทางเคมีของ amphotericin B	5
3	โครงสร้างทางเคมีของ fluconazole	7
4	กระบวนการสร้าง ergosterol และตำแหน่งการถูกยับยั้ง	8
5	กลไกการดื้อยา <i>C. albicans</i>	13
6	ผังแสดงกลไกการดื้อยา Fluconazole ในเชื้อ <i>Candida</i>	14
7	แสดงการแยกเซลล์เดี่ยวด้วยเครื่อง Single manipulator	20
8	การหาค่า MIC ด้วย Microdilution technique ใน microtiter plate Well	23
9	แสดงขนาด PCR product ของยีน <i>ERG11</i> จาก template cDNA	33
10	แสดงการทดสอบความไวของ template cDNA ในปฏิกิริยา PCR สำหรับยีน <i>TAC1</i> และขนาดของ PCR product	36
11	แสดงขนาดของ PCR product ของยีน <i>MDR1</i> จาก template cDNA	37
12	แสดงขนาด PCR product ของยีน <i>TAC1</i> จาก template cDNA	37
13	แสดงขนาด PCR product ของยีน <i>CDR1</i> จาก template cDNA	38
14	แสดงขนาด PCR product ของยีน <i>CDR2</i> จาก template cDNA	38

บทนำ (Introduction)

Candida albicans (*C. albicans*) เป็นเชื้อราจำพวกยีสต์ (yeast) ซึ่งพบเป็น normal flora อยู่บริเวณเยื่อบุปาก ทางเดินอาหารและช่องคลอด โดยอยู่ในรูปของ yeast form เมื่อมีปัจจัยส่งเสริมเหมาะสม เชื้อนี้จะก่อให้เกิดโรคได้จากจำนวนที่เพิ่มขึ้น และหรือ virulences factor อื่น ๆ จึงจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic fungus) ประเภทหนึ่ง โดยส่วนใหญ่เชื้อมักจะเปลี่ยนรูปจาก yeast เป็น pseudohyphae และหรือ hyphae การเปลี่ยนรูปแบบเช่นนี้ก็เป็น virulence factor ประเภทหนึ่ง ที่ก่อให้เกิดโรคเรียก candidiasis หรือ candidosis พยาธิสภาพพบได้ในหลายอวัยวะ เช่น ในช่องปาก ระบบสืบพันธุ์ และการติดเชื้อทั่วทุกระบบของร่างกาย (1) สำหรับอัตราการก่อโรคคิดได้เป็นร้อยละ 50 ของโรคที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Candida* ทั้งหมด (2) ในปัจจุบันโรค Oropharyngeal candidiasis (OPC) เป็นโรคในกลุ่มโรค candidiasis ที่พบได้บ่อยคือ พบได้ในผู้ป่วยกลุ่มมะเร็งหรือเปลี่ยนถ่ายอวัยวะที่ได้รับยากเคมีบำบัดหรือในกลุ่มที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยโรคเอดส์ แต่ในบางครั้งโรคติดเชื้อ *Candida* สามารถพบได้ในคนที่มีสุขภาพปกติ เช่น vaginal infection ซึ่งพบได้ในผู้หญิงที่มีสุขภาพปกติ

Oral candidiasis แบ่งตามอาการทางคลินิก ได้เป็น 5 แบบ คือ

1. Acute pseudomembranous candidiasis (oral thrush) เป็นลักษณะอาการที่พบบ่อยที่สุด เกิดจากการบุกรุกของเชื้อ *Candida* ในบริเวณ buccal mucosa เป็นรอยโรคฝ้าขาวเปื่อยยุ่ยคล้ายคราบน้ำนมที่บริเวณกระพุ้งแก้ม เยื่อบุเพดานปาก นอกจากนี้ยังอาจพบว่าการอักเสบที่เยื่อบุด้านล่าง เห็นเป็นรอยแดง มักพบในเด็กเล็ก ๆ และในคนสูงอายุ สำหรับในกรณีผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV จะพบว่ารอยโรคมีความรุนแรง ลามไปที่ลิ้นและหลอดอาหาร (pharynx) ทำให้เกิดความลำบากในการรับประทานอาหาร เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยน้ำหนักลด

2. Acute atrophic candidiasis (antibiotic candidiasis) เป็นอาการที่อาจเกิดจากเชื้อเป็นสาเหตุโดยตรงหรือเกิดหลังจาก pseudomembrane ของ thrush หลุดจากรอยโรค มักพบในคนไข้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ (antibiotic) หลายชนิดเป็นเวลานาน หรือผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย corticosteroid โดยบริเวณที่พบบ่อยมักเป็นบริเวณด้านบนของลิ้น

3. Chronic atrophic candidiasis เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดในผู้ต้องใส่ฟันปลอมและมีสุขภาพทางช่องปากผิดปกติและ มักพบเป็น chronic erythema และ edema ของ palate ที่อยู่ใต้แผ่นฟันปลอม

4. Candida cheilosis or perleche มีอาการเจ็บมากที่มุมปากทั้งสองข้าง เป็นผื่นแดง, เปื่อย, และรอยโรคแตกเป็นร่อง (erythema, maceration, fissuring) และ พบบ่อยในผู้สูงอายุที่ไม่มีฟันหรือฟันขบกันไม่ดีทำให้มีน้ำลายค้างที่มุมปากบ่อยๆ

5. Chronic hyperplastic candidiasis (candida leukoplakia) ลักษณะอาการเป็นฝ้าขาวที่หนาติดแน่นพบในคนไข้ chronic mucocutaneous candidiasis



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Survey of Related Literature)

การรักษาผู้ป่วย Candidiasis ไม่จำเป็นต้องรักษาผู้ป่วยทุกรายที่พบเชื้อ *Candida* เนื่องจากเชื้อที่แยกได้อาจเป็น normal flora แต่เมื่อไรก็ตามที่เชื้อเปลี่ยนเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic fungi) เช่น ในกรณีเป็นผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือได้รับยากดภูมิคุ้มกันก็จำเป็นต้องได้รับการรักษา และการรักษาในผู้ป่วยบางรายต้องใช้เวลาาน โดยทั่วไปยาที่ใช้ในการรักษา ได้แก่ ยาในกลุ่ม polyene และ azole ซึ่งยับยั้งการสร้างผนังเซลล์และ nucleotide (3)

การแยกประเภทของยาด้านเชื้อรา จำแนกได้ 2 แบบ คือ

1. โครงสร้างทางเคมี จำแนกเป็น

- กลุ่ม polyene (amphotericin B, nystatin)
- กลุ่ม azole ได้แก่ imidazole derivatives (miconazole, ketoconazole), triazole (itraconazole, fluconazole)
- กลุ่ม fluorinated pyrimidine derivatives :flucytosine, allylaminederivatives (terbinafine)
- อื่นๆ เช่น griseofulvin, tolnaftate, undecylenic acid เป็นต้น

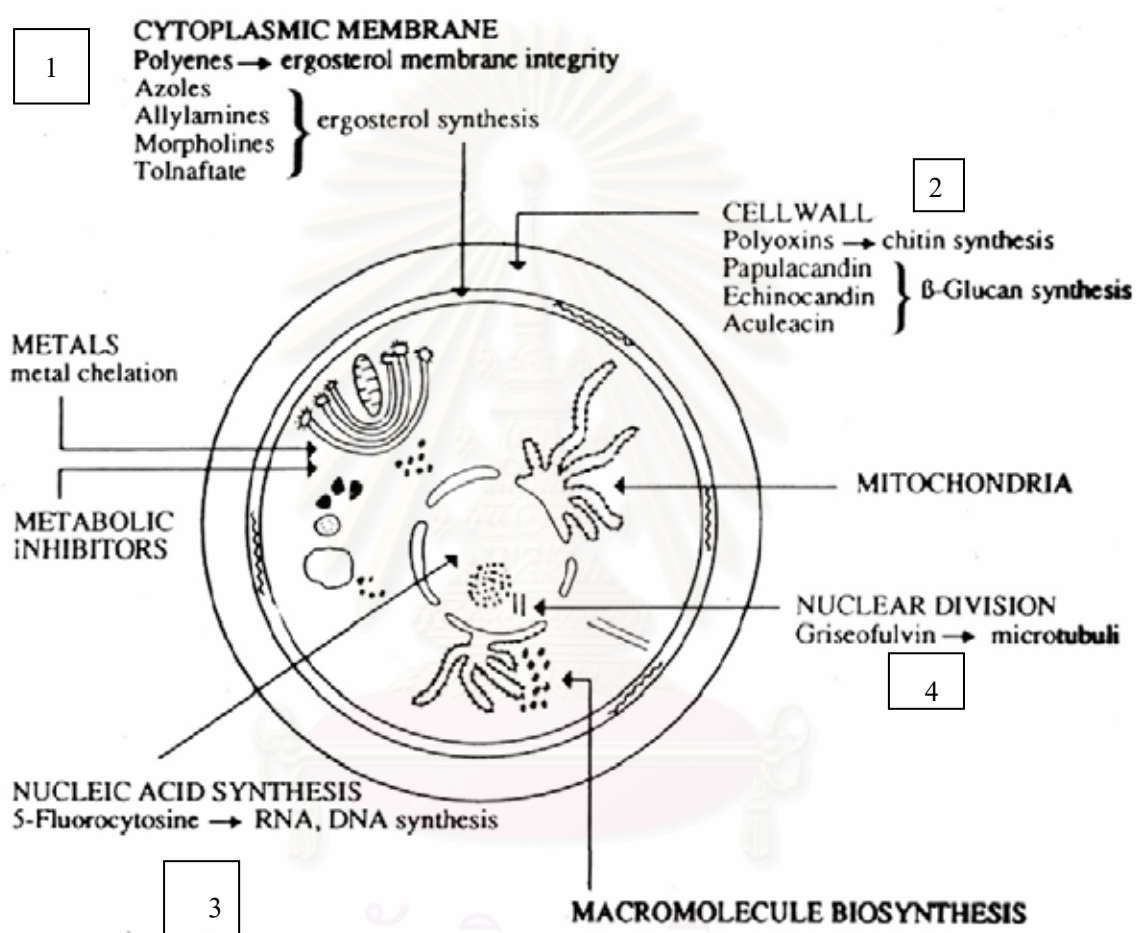
2. การใช้ทางคลินิก จำแนกได้เป็น

- ประเภทที่ได้รับยาแบบฉีดและรับประทานเพื่อการรักษาการติดเชื้อทั่วร่างกาย (systemic fungal infection) ได้แก่ amphotericin B, ketoconazole, griseofulvin
- ประเภททาหรือยาเหน็บ เพื่อการรักษาการติดเชื้อเฉพาะที่ (Topical infection) ได้แก่ nystatin, tolnaftate, econazole

ตำแหน่งการออกฤทธิ์ (target of action) ของยาด้านเชื้อรา มีหลายตำแหน่งขึ้นอยู่กับชนิดของยา (รูปที่ 1) สรุปได้ดังนี้

1. ยากลุ่ม polyoxins ออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้าง chitin ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ (cell wall) และยา papulacandin echinocandin และ aculeacin ที่ออกฤทธิ์ขัดขวางกระบวนการสร้าง beta-glucan (รูป 1 ตำแหน่ง 1)
2. ยากลุ่ม polyenes จะทำให้เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytolasmic membrane) เสียคุณสมบัติการปกป้องเซลล์ และยากลุ่ม azoles allylamines morpholines และ tolnaftate จะไปขัดขวางความสมบูรณ์กระบวนการสร้าง ergosterol ที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytolasmic membrane) (รูป 1 ตำแหน่ง 2)

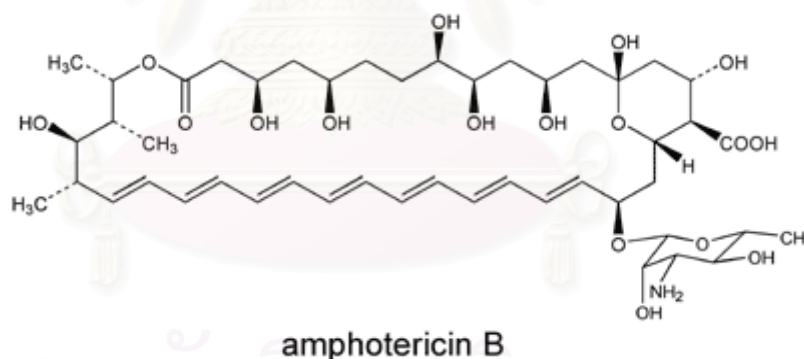
3. ยาที่มีฤทธิ์ขัดขวางกระบวนการการสังเคราะห์สารพันธุกรรมและการสร้างโปรตีน ได้แก่ ยา 5-fluorocytosine (รูป 1 ตำแหน่ง 3)
4. ยาที่ออกฤทธิ์ที่ microtubule คือ ยา griseofulvin (รูป 1 ตำแหน่ง 4)



รูป 1 แสดงตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาด้านเชื้อราชนิดต่างๆ ในเซลล์เชื้อรา **1** พังเซลล์ (cell wall) และกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ที่ cell wall **2** เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) และกลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ที่ cytoplasmic membrane **3** แห่งที่มีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และยาที่ออกฤทธิ์เกี่ยวกับการสังเคราะห์ดังกล่าว และ **4** ตำแหน่งที่นิวเคลียสแบ่งตัวและยาที่เกี่ยวข้อง (2)

กลไกการทำงานของยาต้านเชื้อรา (Mechanism of action of antifungal drug)

1. Polyenes เป็นกลุ่มยาที่จับกับ ergosterol ที่เยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา มีคุณสมบัติการซึมผ่านมากขึ้น เกิดการรั่วของ monovalent, divalent cation เช่น Na^+ , K^+ , Ca^{++} และสาร metabolite อื่นๆ จากภายในเซลล์สู่นอกเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด ยากลุ่มนี้ได้แก่ amphotericin B (รูป 2) เป็นยาฆ่าเชื้อรา (fungicidal) ที่ออกฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อราหลายชนิด เช่น *Candida* spp. *Aspergillus* spp. และ *Histoplasma capsulatum* เป็นต้น อย่างไรก็ตามยากลุ่มนี้มีข้อจำกัดในการบริหารยา คือ ต้องให้ทางเส้นเลือด (intravenous vein, IV) เท่านั้น และการดูดซึมของยาในทางเดินอาหารต่ำ นอกจากนี้ยังมีผลข้างเคียง (side effect) กับผู้ป่วย เช่น มีความเป็นพิษสูงกับไต ทำให้มีอาการปวดศีรษะ เป็นไข้ หลอดโลหิตดำอักเสบ (Thrombophlebitis) และ อาการแพ้ จึงมีการพยายามพัฒนาเป็นรูปแบบลิโปโซม (liposome) เพื่อให้มีการดูดซึมที่ดีขึ้นและให้มีอาการข้างเคียงน้อยลง ในที่สุดก็มีอีกหนึ่งรูปแบบเกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อเสียอีกเล็กน้อยในเรื่องราคาต้นทุน



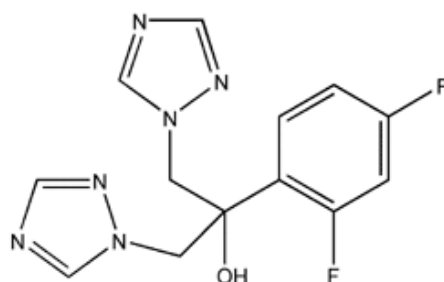
รูป 2 โครงสร้างทางเคมีของ amphotericin B (4)

2. Azole เป็นยาต้านเชื้อราชนิด fungistatic ทำหน้าที่ขัดขวางกระบวนการสร้าง ergosterol เมื่อพิจารณาโครงสร้างของยา จะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

- 2.1 กลุ่ม imidazoles มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย 1 hexagonal ring และ 2 pentagonal ring ซึ่งมีไนโตรเจน 2 โมเลกุล/ ring

2.2 กลุ่ม triazoles เป็นกลุ่มที่โครงสร้างของยาเป็น pentagonal ring ประกอบด้วยไนโตรเจน 3 โมเลกุล/ring

เนื่องด้วยขีดจำกัดของยา amphotericin B ในการบริหารยา การดูดซึม และผลข้างเคียงของยา ทำให้ในปัจจุบันนิยมใช้ยาในกลุ่ม azole ในการรักษาโรคติดเชื้อรามากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มโรคติดเชื้อ *Candida* ยากลุ่มนี้มีการพัฒนาเป็นลำดับดังนี้ คือ เริ่มจากกลุ่ม imidazole ได้แก่ clotrimazole miconazole และ ketoconazole ต่อมาเป็นกลุ่ม triazoles ได้แก่ fluconazole (5) (รูป3) itraconazole และ voriconazole ยากลุ่มนี้ใช้กันอย่างแพร่หลาย และมีประสิทธิภาพสูง มีข้อดี คือ มีความปลอดภัยในการบริหารยา ทำให้มีผลข้างเคียงกับผู้ป่วยน้อยกว่ายาในกลุ่ม polyenes และยังสามารถบริหารได้ทั้งทางการกินและฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (6) ยากลุ่ม azole นี้จึงเป็นที่นิยมใช้ในการรักษา OPC ทำให้อัตราการเสียชีวิตในการรักษามากขึ้น (7, 8) ด้วยอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *C. albicans* ในผู้ป่วยมีจำนวนเพิ่มขึ้น (9-15) ผนวกกับการใช้ยากลุ่ม azole ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องมีผลกระทบต่อการรักษาไม่ว่าจะเป็นจำนวนครั้งของการให้ยา การตอบสนองต่อยา และอัตราการตายของผู้ป่วยที่เกิดขึ้นจากการรักษา ในปี ค.ศ. 1998 White และคณะได้รายงานว่าการดื้อต่อยานี้พบทั้ง primary และ secondary resistance และมีหลักฐานการรายงานอีกหลายฉบับที่แสดงถึงความสอดคล้องของการดื้อยาทางด้าน *in vivo* และ *in vitro* เมื่อวิเคราะห์สาเหตุการดื้อยาระหว่าง *in vivo* และ *in vitro* ในผู้ป่วย systemic infection พบว่า ปัจจัยในผู้ป่วยเองเป็นปัจจัยสำคัญ คือ อาการโรครุนแรง การตอบสนองต่อการรักษาจะมีน้อยลง การที่เชื้อสร้าง biofilm ในช่องปาก บริเวณที่คาสาย catheter เยื่อต่างๆ ก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยา ทั้ง ๆ ที่เมื่อทำการศึกษาเชื้อเหล่านี้ศึกษา *in vitro* แล้ว เชื้อนั้นก็ป็นสายพันธุ์ที่ไวรับต่อยา (susceptible strain) หรือในทางตรงกันข้าม การติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อที่มีคุณสมบัติดื้อยาก็ไม่ได้บ่งชี้ว่าการรักษาโรคที่เกิดจากเชื่อนั้นจะล้มเหลว

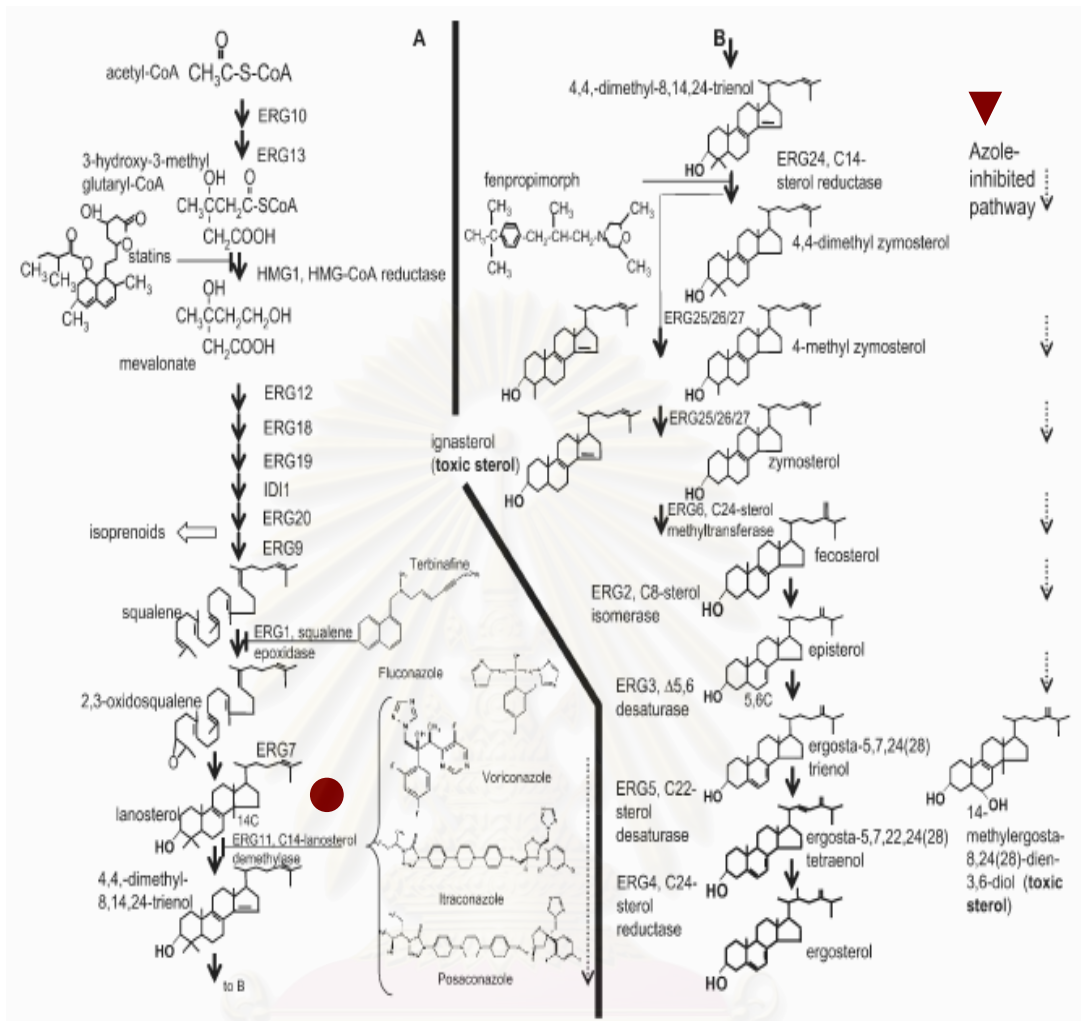


fluconazole

รูป 3 โครงสร้างทางเคมีของ fluconazole (systemic name: 2-(2,4-difluorophenyl)-1,3-bis (1H-1,2,4-triazol-1-yl) propan-2-ol) (8)

สาร ergosterol เป็นอนุพันธ์หนึ่งของ sterol ที่มีปริมาณคิดเป็น 25 % ของน้ำหนักสารประกอบใน cell wall ของเชื้อรา สารนี้จึงเป็นตำแหน่งที่สำคัญตำแหน่งหนึ่งในการออกแบบยาต้านเชื้อราที่นิยมใช้ในปัจจุบัน กระบวนการสร้าง ergosterol เริ่มจาก substrate Acetyl - CoA จากนั้นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ในกระบวนการสร้างสาร chloesterol ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม กระบวนการนี้ประกอบด้วยหลายขั้นตอนในการเปลี่ยนจนกระทั่งได้เป็นสาร ergostrol ดังรูป 4(A) – 4(B)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูป 4 กระบวนการสร้าง ergosterol และตำแหน่งการถูกยับยั้ง แสดงตำแหน่งที่ยากลุ่ม azole เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ระหว่างกระบวนการสร้าง ergosterol ที่ควบคุมด้วยยีน ERG แสดงกระบวนการขัดขวางการสร้าง ergosterol และเกิดเป็น toxic sterol (modified from (16))

ขั้นตอนที่สำคัญที่ยากลุ่ม azole เข้าไปขัดขวางการสร้าง ergosterol คือ ขั้นตอนที่ยาจับกับเอนไซม์ C14 α - lanosterol demethylase เมื่อได้ intermediate compound เป็น lanosterol ยีน ERG11 ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์นี้ ในที่สุดจะเกิดเป็น toxic sterol (รูป 4(B) ขวาสุด) แทนการเกิดเป็นสาร ergosterol ผลสุดท้ายคือ เชื้อก็จะถูกทำลายเนื่องจากไม่มีสาร ergosterol ใน cell wall

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา (ตาราง 1) ได้แก่

- ตัวเชื้อ เช่น ปริมาณเชื้อ ความสามารถในการสร้าง biofilm การเปลี่ยนรูปร่างของยีสต์เป็นเส้นสาย และสายพันธุ์
- ยา เช่น คุณสมบัติเป็น fungistatic หรือ fungicidal ปริมาณของยา และจำนวนครั้งในการให้ยา การสะสมของยา กลไกการทำงานของยา (Pharmacokinetic) และ Drug – drug interaction
- ผู้ป่วย เช่น สถานะการตอบสนอง ตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพ ความรุนแรงของการติดเชื้อ การที่มีสิ่งแปลกปลอมเช่น การคาสาย catheter เป็นต้น (17, 18)

ตาราง 1 ปัจจัยที่ทำให้เกิด clinical antifungal drug resistance (19)

Fungal factors	Drug factors	Host (and other) factors
Initial MIC	Fungistatic nature of drug	Immune status
Cell type	Dosing	Site of infection
Yeast/hyphae	Frequency	Severity of infection
Switch phenotype	Quantity	Presence of foreign materials (dentures, catheters, prosthetic valves)
Serotype	Schedule (intermittent vs continuous)	Abscess formation
Genomic stability regimen	Cumulative dose	Patient noncompliance with drug regimen
Size of population	Pharmacokinetics	
Population “bottlenecks”	Absorption	
Biofilms	Distribution	
	Metabolism	
	Drug – drug interactions	

กลไกการดื้อยา (Antifungal resistant mechanism)

ในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะกลไกการดื้อยา fluconazole ของเชื้อ *C. albicans* มี 3 กระบวนการ ดังนี้

1. Ergosterol biosynthesis pathway

ยาในกลุ่ม azole จะจับกับ lanosterol 14 α - demethylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถอดรหัสจากยีน *ERG11* ทำให้กระบวนการสร้าง ergosterol ไม่สมบูรณ์ ฉะนั้นปริมาณของ ergosterol ใน cell wall จึงลดลงไปด้วย ในขณะที่เดียวกันในเซลล์จะมีการสะสมสาร 14 α - methylated sterols เช่น lanosterol และ 14 α - methyl -3, 6 - diol ซึ่งทำให้โครงสร้างของ cell wall เปลี่ยนไปดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จากการทบทวนผลงานการศึกษาต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับกลไกการดื้อยา fluconazole อาจสรุปว่าเกิดจาก 3 กลไก ดังนี้

1.1 การเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน *ERG11* (mutation of *ERG11* gene) มีผลทำให้ ลำดับ amino acid เปลี่ยนแปลงไป คือ P450 dependent sterol C14- α -demethylase มีโครงสร้างเปลี่ยนไปจากเดิม ดังนั้น ความสามารถในการจับระหว่างยากับเอนไซม์จึงลดลงทำให้การสร้าง ergosterol (รูป 5A) เป็นไปอย่างปกติ มีรายงานการเปลี่ยนแปลง amino acid ในโครงสร้างหลายตำแหน่ง (point mutation) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาที่มีรายงานมาแล้วก็ยังไม่สามารถจะสรุปได้ชัดเจนถึงผลที่ก่อให้เกิดกลไกการดื้อยา

1.2 การแสดงออกของยีนมากเกินไป (Overexpression of *ERG11* gene) กลไกโดยทั่วไปของการดื้อยาในกลุ่ม eukaryote cell ส่วนใหญ่เกิดจากการเพิ่มจำนวนยีน มักมาจากการเพิ่มจำนวนยีน เนื่องจากการเพิ่มจำนวนยีนมักส่งผลถึงการเพิ่มการทำงานของยีนด้วย ในที่นี้ เมื่อ *ERG11* ของเชื้อ *C. albicans* มีจำนวนเพิ่มขึ้น ก็จะทำให้เกิดโปรตีนเพิ่มขึ้นด้วย โปรตีนดังกล่าวคือ เอนไซม์ P450 dependent sterol C14- α -demethylase ดังนั้นในการรักษาจึงจำเป็นต้องใช้ยาในปริมาณมากขึ้น เพื่อให้การจับระหว่างยากับเอนไซม์มีความสมดุล ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการสร้าง ergosterol (รูป 5B) อย่างไรก็ตามมีรายงานขัดแย้งกับทฤษฎีที่กล่าวมา (20, 21) และยังไม่สามารถศึกษาถึงผลที่เกิดจากการ overexpress ของยีนนี้เพียงยีนเดียวได้

1.3 การเปลี่ยนแปลงกระบวนการสร้าง ergosterol ซึ่งเกิดจากการทำงานของ Erg3p ใน inactivated form (Alteration in the ergosterol biosynthesis by inactivation of Erg3p) โดยทั่วไป กระบวนการสร้าง ergosterol จะสมบูรณ์ได้

ต้องอาศัยยีนหลายชนิดในการทำงาน ขั้นตอนสำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งที่มีผลกระทบต่อการศึกษาจะเป็นกระบวนการการทำงานของยีน *ERG3* ที่ควบคุมการสร้าง Erg3p (Δ 5,6 desaturase) ในกรณีที่ยา fluconazole ทำปฏิกิริยากับ C14-lanosterol demethylase และเกิดการสะสมของสารกลุ่ม 14 – methyl intermediate ที่เป็น intermediate compound โปรตีน Erg3p จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารกลุ่มนี้ไปเป็น 14 α -methylergosta – 8,24(28) – dien – 3,6 – diol (รูป 4B และ 5E) ซึ่งเป็น toxic sterol ดังนั้น ถ้าไม่มีการทำงานของยีน *ERG3* หรือ Erg3p เชื้อก็ไม่ควรจะเกิดการดื้อต่อยา (16, 22) ข้อมูลเหล่านี้เป็นเพียงสมมติฐานขั้นต้น และพบว่าเชื้อต่าง genus และ specie ก็อาจให้ผลที่แตกต่างกันได้ เช่น การทดลองในเชื้อ *S. cerevisiae* กับ *C. albicans* นั้นให้ผลตามสมมติฐานข้างต้น แต่ใน *C. glabrata* ให้ผลที่แตกต่าง

2. ABC (ATP-binding cassette) transporters

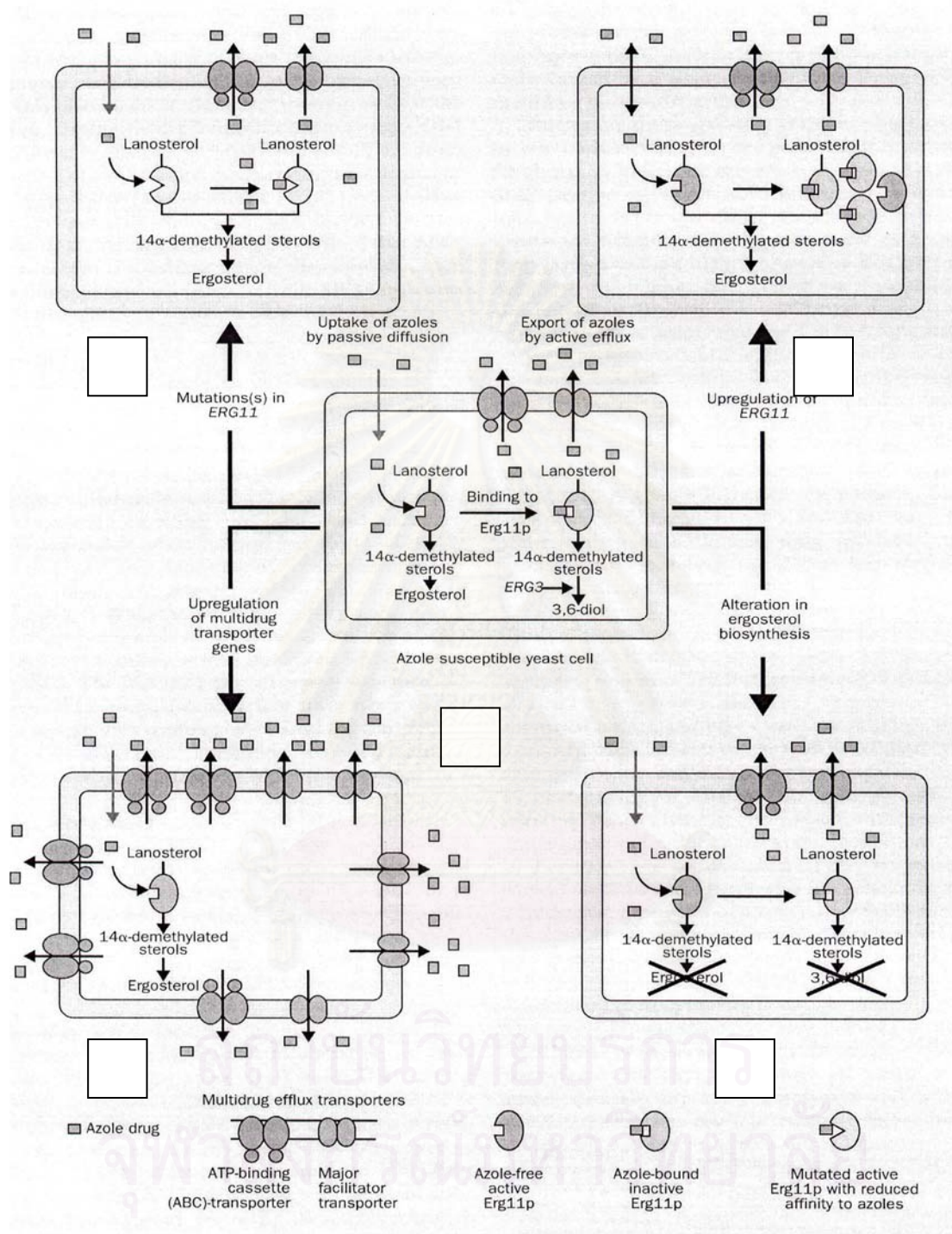
กระบวนการส่งยาออกจากเซลล์ในเชื้อ *C. albicans* มียีนที่เกี่ยวข้องกับ ABC transporters 6 ยีน ขณะนี้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีนเพียง 4 ยีนคือ *CDR1-4* และเฉพาะยีน 2 ชนิดเท่านั้น คือ *CDR1* และ *CDR2* ที่มีหลักฐานการแสดงความสัมพันธ์ของยีนกับการเกิด multiple azole resistance (Itraconazole, Ketoconazole และ Fluconazole เป็นต้น) เช่น ในการทดลองเมื่อใส่พลาสติกที่มีจำนวนยีนเหล่านี้สูงใน *S. cerevisiae* ที่ delete ยีนนี้แล้ว พบว่าเชื้อมีความสามารถในการดื้อต่อยาสูงขึ้น (23-25) และพบว่าหน้าที่ของ *CDR1* และ *CDR2* ใน *C. albicans* คล้ายกับหน้าที่ของยีน *PDR5* ใน *S. cerevisiae* (23, 26) สำหรับกลไกการทำงานของ ABC transporters เริ่มขึ้นเมื่อมีการจับระหว่าง small hydrophobic substrate molecules ที่ตำแหน่ง nucleotide binding domains (27) กับบริเวณ high affinity site ด้านในของ plasma membrane ทำให้ substrate ผ่านไปยังส่วน extracellular leaflet โดยกระบวนการทำงานนี้ยังต้องอาศัยการ hydrolysis ของ ATP (รูป 5D, 6) จึงจะทำให้มีการส่งผ่านของยาออกนอกเซลล์เชื้อได้

ในปัจจุบันมีรายงานการพบยีนใหม่ที่น่าจะมีบทบาทสำคัญในกลไกการดื้อยา คือ ยีน *TAC1* ทำหน้าที่เป็น transcriptional activator ของยีนกลุ่ม *CDR* โดย Tac1p เป็นโปรตีนในกลุ่มของ zinc – finger protein (28) การทำงานของ Tac1p จะจับกับ drug response element (DRE) บริเวณที่มีส่วนซ้ำของเบส CGG สองครั้ง ตำแหน่งของยีนนี้อยู่ใกล้กับบริเวณ mating – type – like (MTL) locus ในปี ค.ศ. 2004 Coste และคณะรายงานเกี่ยวข้องระหว่างยีน *TAC1* กับการดื้อยา โดยในการทดลอง ทำการกระตุ้นเชื้อ non *TAC1* - *C. albicans* ด้วย homozygous clinical azole-resistant strain

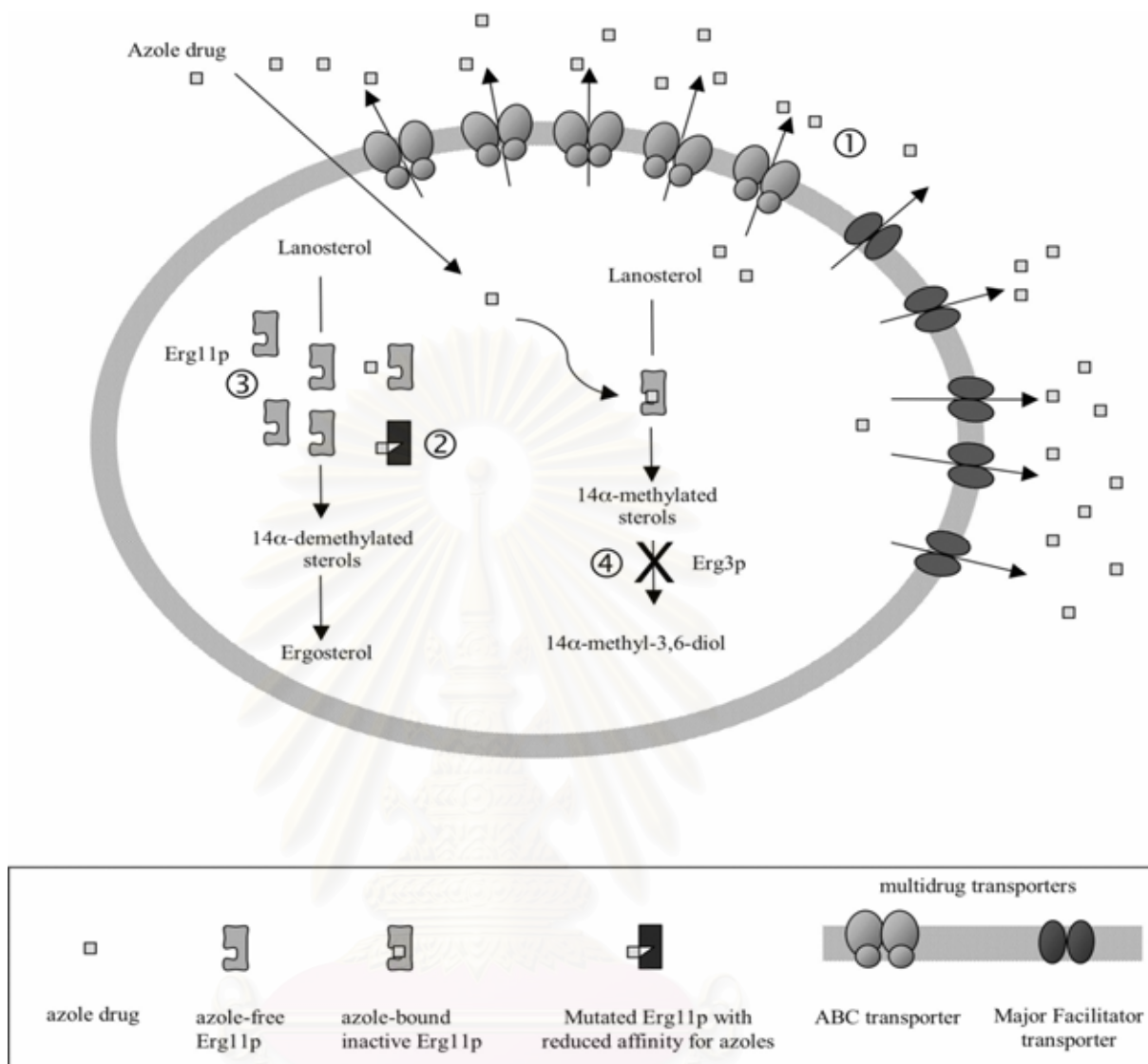
(DSY296) ที่มี *TAC 1* allele (28) ปรากฏว่าเชื้อที่ถูกกระตุ้นมีการแสดงออก (expression) ของยีน *CDR1* และ *CDR2* เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อนำ azole-susceptible clinical strain (DSY294) ที่เป็น heterozygous มาทดสอบ ผลการทดลองที่ได้ คือ เชื้อที่ถูกกระตุ้นไม่คื้อต่อยา fluconazole เมื่อมีการศึกษาด้วยวิธี Microarray และ Northern blot analysis พบว่า *TAC1* ทำให้เกิด overexpression ของ azole – resistant strains โดย upregulate ของ *CDR1* และ *CDR2* (29) และยังคงควบคุมการแสดงออกของยีนอื่นอีกอย่างน้อยสี่ยีน คือ *RTA3* *IFU5* *HSP12* และ *PDR16* (28, 30) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการทดลองที่บ่งบอกถึงความเกี่ยวข้องระหว่าง homozygosity ที่ mating – type locus กับ azole – resistance ใน clinical isolates (31) และยีนนี้มี 7 subtype คือ *TAC1-1* ถึง *TAC1-7* (32)

3. Major facilitator protein or Mdr1p (multidrug resistance protein 1)

ยีน *MDR1* หรือ *BEN1* ควบคุมการสร้าง major facilitators (MFS) protein ที่มีผลจำเพาะทำให้เชื้อคื้อต่อยา fluconazole โปรตีนเหล่านี้อยู่บริเวณ plasma membrane ทำหน้าที่เป็น proton antiporters คือ ทำให้สารในกลุ่ม hydrophobic compounds ไหลออกจากเซลล์ สารเหล่านั้น ได้แก่ benomyl, methorexate, cycloheximide, benzotriazoles, 4 – nitroquinoline – N - oxide, fluconazole และ sulfometuron methyl (33, 34) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาพบว่า เมื่อ disrupt *MDR1* ใน clinical isolate ที่มีความไวรับสูงต่อยา fluconazole จะเกิดการคื้อยาขึ้น (35) นอกจากนี้ยังพบว่า benomyl สามารถกระตุ้นการทำงานของยีน *MDR1* ได้ แต่ในบางสายพันธุ์ที่คื้อต่อ fluconazole บางสายพันธุ์ อาจมี mutation ใน trans regulatory factor เป็นอีกหนึ่งปัจจัยร่วมด้วย (36, 37) (รูปที่ 6)



รูป 5 กลไกการดื้อยา *C. albicans* แยกตามรายละเอียดดังนี้ A: การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสใน ยีน *ERG11*, B: การเพิ่ม expression ของยีน *ERG11*, C: ลักษณะของเชื้อที่ไวต่อยา Fluconazole, D: การเพิ่ม expression ของยีนที่สร้าง efflux pump, E: การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของ sterol (38)



รูป 6 ฟังแสดงกลไกการดื้อยา Fluconazole ในเชื้อ *Candida* (39) ① การลดลงของยาเนื่องจาก upregulation ของ ABC (ATP-binding cassette) และ ยีน major facilitator multidrug transporter ② ความสามารถที่ลดลงของ ERG11p ต่อการจับกับยา Fluconazole ③ การเพิ่มขึ้นของ ERG11p ในเซลล์ ④ Inactivated form ของ Erg3p (sterol C5,6-desaturase) ขัดขวางการสร้าง 14 α -methyl-3,6-diol ซึ่งเป็นสารพิษ

การศึกษาการดื้อยาในหลอดทดลองโดยส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในเชื้อ *S. cerevisiae* และ *C. albicans* โดยเชื้อที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อ (population of cells) ที่เก็บในห้องปฏิบัติการ หลังจากแยกได้จากกรวยโรคของผู้ป่วย รายงานการศึกษาเมื่อนำเชื้อมาทำ single step selection โดยกระตุ้นเชื้อนั้นในยา fluconazole ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบ mutant ที่เป็น recessive *ERG3* และมี overexpression ของ *ERG11* นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบยีนอื่นที่เกี่ยวข้อง

กับการสร้าง ergosterol เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยา หลังจากทดลองโดยการทำ individual gene deletion ต่อมาเมื่อทำการศึกษา second step wise selection สำหรับ resistance mutant โดยกระตุ้นด้วยยาที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 128 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบ mutation ในยีน *PDR1* มีผลกับการ overexpress ของ ABC transporter genes (*PDR5* และ *SNQ2*) แต่ไม่มีการ overexpress ของ major facilitator gene (*FLR1*) หรือใน *ERG11* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า มียีนหลายยีนที่เกิดการ mutation และมีผลต่อการดื้อต่อยากุ่ม azole และการเกิด mutation ที่มีผลต่อการดื้อยานั้นขึ้นอยู่กับชนิด selective pressure

การศึกษาใน *C. albicans* พบว่าการ overexpress ของยีน *CDR1* *CDR2* *MDR1* และ *ERG11* กับการดื้อยามีรูปแบบที่ไม่แน่นอน เช่นเดียวกับการเกิด mutation เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย microarray จะพบการ overexpress ของยีน 2 รูปแบบ แบบแรก คือมีการ overexpression ของยีน *CDR1* มากกว่ายีนอื่น และแบบที่สอง พบระดับการเปลี่ยนแปลงในยีน *MDR1* มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีนอื่น ๆ ในช่วงแรกหรือช่วงหลังของการถูกกระตุ้น โดยพบในสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติคือแบบเสถียร (stable resistance)

ผลจากการศึกษากลไกการดื้อยาโดยศึกษาทั้ง *in vitro* และ *in vivo* (เชื้อที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อแยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง) ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน โดยมีผลสืบเนื่องจากการ mutation ของยีนที่มีรายงานแล้วหลายตัวและอาจจะเกิดจากยีนอื่น ๆ ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน การศึกษาในปี ค.ศ. 1998 Lopez – Ribot และคณะ รายงานว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 3 ราย ที่มีค่า MIC สูง มีการแสดงออกของยีน *CDR 1* ไม่สอดคล้องกัน คือ เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย 2 ราย มีการแสดงออกของยีน *CDR 1* มากกว่ายีน *CDR 2* *MDR1* และ *ERG11* โดยมีระดับของค่า MIC ที่ต่างกัน และเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยอีกรายหนึ่งมีการแสดงออกของยีนทั้ง 4 ตัวไม่แตกต่างกันทั้ง ๆ ที่ค่า MIC มีระดับสูงกว่าเชื้อ 2 สายพันธุ์ข้างต้น การศึกษาดังกล่าวไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงกลไกการดื้อยาอย่างชัดเจน เมื่อทำการศึกษาเชื้อที่แยกได้ในระยะเวลาต่างกันจากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV สายพันธุ์ที่แยกได้ในช่วงต้นที่ค่า MIC เริ่มสูงขึ้น ระดับของ *MDR1* เพิ่มขึ้น ตามด้วยการเปลี่ยนแปลงของยีน *ERG11* และในสายพันธุ์ที่แยกได้ในช่วงท้ายมียีนในกลุ่ม *CDR* ที่ overexpress (40) มีรายงานที่สอดคล้องกัน(41, 42) เช่น ในปี ค.ศ 1996 Sanglad และคณะ(41) พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสูงของ mRNA ของ *CDR1* *CDR2* *MDR1* และ *ERG11* กับการดื้อยาของเชื้อ หลังจากที่ได้ทำการศึกษาใน clinical isolate จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV ปี ค.ศ. 2001 Perea และคณะ พิสูจน์ให้เห็นว่า การ overexpress ของ efflux pump ทำให้เชื้อ *C. albicans* ดื้อต่อยา fluconazole สูงขึ้นได้ถึง 85% เมื่อเปรียบเทียบกับ wild type (42) และยังมีการศึกษาว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA

ของ putative ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสหรือไม่ โดยศึกษาใน clinical isolate จำนวนมาก ไม่พบว่า มีความสัมพันธ์กัน และการเกิดการดื้อยาเกิดจากหลายกลไกและมีความซับซ้อนจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยทางพันธุศาสตร์ต่อไป (17) นอกจากนี้ยังมีการทดลอง in vitro ที่ให้ผลสอดคล้องกับผลข้างต้น ด้วยการ knockouts ยีนที่ควบคุมระบบ efflux pump โดยใช้ *Candida* เป็นต้นแบบในการศึกษา (23, 41)

ในช่วงระยะเวลา 10 ปีนี้ พบว่าเชื้อ *C. albicans* ที่แยกจากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีแนวโน้มของการดื้อต่อยา fluconazole เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับประเทศอื่น และด้วยวิธีการใช้ยา fluconazole มีความหลากหลายในแต่ละประเทศ ในที่นี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษากลไกการดื้อยา โดยมุ่งหาความสัมพันธ์ระหว่าง transcriptional regulation ของยีนที่ควบคุม molecular mechanism ของ multidrug resistance จากเชื้อ *C. albicans* โดยกระตุ้น single cell ของเชื้อที่มีความไวรับมาด้วยยา fluconazole ตรวจวัดค่า MIC และศึกษา expression ของ cDNA และลำดับเบสของ ยีน *ERG11* และการแสดงออกของยีน *CDR1CDR2 MDR1* และ *TAC1* ใน azole – sensitive และ azole – resistant isolates โดยวิธี Reverse Transcriptase - PCR (RT – PCR)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการทำงานของ putative resistant genes ได้แก่ *ERG11* *MDR1* *CDR1* *CDR2* และ *TAC1* ใน *C. albicans* ที่ถูกกระตุ้นให้ดื้อยาด้วย fluconazole
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบนยีน *ERG11* ใน *C. albicans* ที่ถูกกระตุ้นให้ดื้อยาด้วย fluconazole



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการวิจัย (Procedure)

1. การคัดเลือกและการเตรียมเชื้อ *C. albicans* ที่ใช้ในการศึกษา

การคัดเลือกเชื้อ

เชื้อ *C. albicans* จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ K39.1 K44.1 K49.1 K51.1 K54.1 และ K78.1 ซึ่งแยกได้จากโรคในช่องปากผู้ป่วยเอดส์ที่เป็นโรคติดเชื้อยีสต์ที่ช่องปาก (Oropharyngeal candidiasis) และผู้ป่วยเหล่านี้มีประวัติได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อรา (ตาราง 2) และเชื้อเหล่านี้เก็บรักษาที่ -70 องศาเซลเซียส หน่วยร่ววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกณฑ์การคัดเลือกเชื้อ ในการศึกษาคัดเลือกรักษาจากเชื้อที่มีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ที่แสดงถึงความไวรับต่อยา fluconazole

วิธีการทดสอบที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ คือวิธี Epsilonometer (Etest) (AB biodisk, Solna, Sweden) เพื่อหาค่า MIC วิธีการที่ใช้ในการทดสอบอ้างอิงตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Etest Reading Guide for Yeast: Etest technical guide4, AB Biodisk, Sweden) กล่าวโดยย่อคือ วางแผ่นยา fluconazole ที่มีความเข้มข้นของยาเป็น gradient ระหว่าง 0.016 ถึง 256 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบ (ความเข้มข้นของเชื้อ *C. albicans* ที่ใช้ในการทดสอบคือ 0.5 McFarland) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 – 48 ชั่วโมง และอ่านผลสำหรับ วิธี Microdilution test อ้างอิงตามวิธีมาตรฐานของ NCCLS – M27 – A (NCCLS; National Committee for Clinical Laboratory Standards) (รายละเอียดวิธีการทำในวิธีดำเนินการวิจัยข้อ 4)

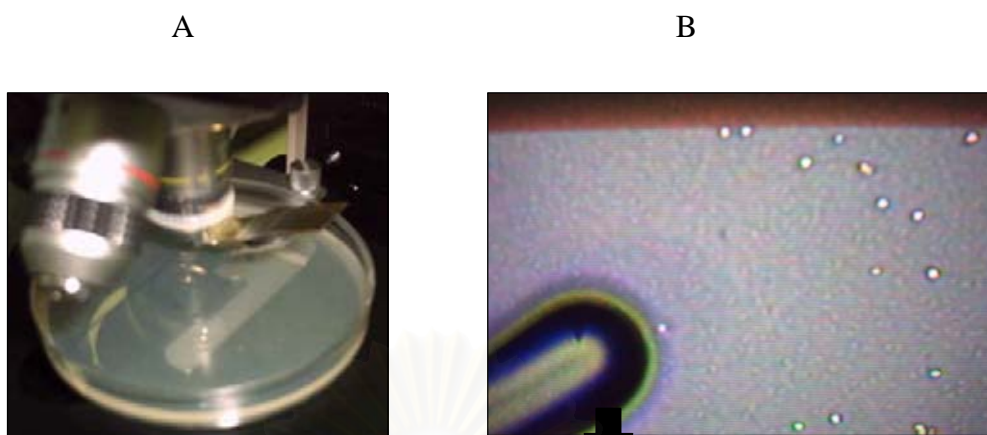
ตาราง 2 แสดงเชื้อ *C. albicans* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากรอยโรคในช่องปากผู้ป่วยเอดส์ที่เป็นโรค Oropharyngeal candidiasis จำนวน 6 ราย และผู้ป่วยเหล่านี้ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อรา

<i>C. albicans</i>	ชนิดของยาและขนาดยาที่ใช้ในการรักษา
K39.1	Diflucan 400 mg/day
K44.1	Diflucan 50 mg/day
K49.1	Nizoral
K51.1	Diflucan 400 mg/day
K54.1	Sporal 200 mg/day
K78.1	Diflucan

การเตรียมเชื้อสำหรับการศึกษากลไกการดื้อยา

นำเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บรักษาที่ -70 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มี Sabouraud dextrose broth (SDB) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เขย่าที่ 140 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา streak บน Sabouraud dextrose agar (SDA) เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อสายพันธุ์ที่เลือกนั้นมาแยกเป็นเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี Singel cell manipulation ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่คัดแปลงโดย ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สมณีย์ สุขรุ่งเรือง (วิธีการแยกเซลล์ได้รับคำแนะนำจากคุณบุญช่วย เอี่ยมโกลลากร หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันบำราศนราดูร) และบ่มเซลล์ที่แยกได้นั้น (รูป 7) บน SDA เป็นเวลา 1 วัน จากนั้น inoculate เชื้อที่เจริญแล้วนั้นใน flask ที่มี SDB ปริมาณ 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส เชื้อนี้ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับการกระตุ้นต่อไป

2. การกระตุ้น *C. albicans* ด้วยยา fluconazole (ตาราง 3) เชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น single cell ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จำนวนซ้ำในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ความเข้มข้นยาที่ต่างกัน เท่ากับ 5 ซ้ำ



รูป 7 แสดงการแยกเซลล์เดี่ยวด้วยเครื่อง Single manipulator (A) แสดงการแยก single cell ของ *C. albicans* ที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (B) ลูกศรแสดงปลายของหลอดแก้วที่แยก single cell ออกมา

2.1 กลุ่มควบคุม (Control group) : เป็นกลุ่มการทดลองที่ปราศจากยา วิธีการ เลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (SDB) ที่ไม่มียา โดยเชื้อที่ใช้ต้องปรับให้มีความขุ่นเริ่มต้นเป็น 0.5 McFarland ถ่ายเชื้อปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบ/นาทีที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดวัน แรกปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มี RPMI 1640 ใหม่ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร และเลี้ยงใน สภาวะเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นนี้ทุกวัน จนกระทั่งถึงวันที่ 60 นับจากวันแรกที่ถ่ายเชื้อ เก็บเชื้อในวันที่ 0 (วันแรก) 15 30 50 และ 60 วัน เพื่อนำมาทดสอบ ค่า MIC ด้วยวิธี Microdilution test (ตามวิธีในข้อ 3) สกักดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ (ตามวิธีในข้อ 4 และ 5 ตามลำดับ)

2.2 กลุ่มทดลอง (Experimental group) : เป็นกลุ่มการทดลองที่กระตุ้นเชื้อด้วยยาที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อใส่เชื้อแล้วมีปริมาณเท่ากับ 8 16 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่3) ความขุ่นของเชื้อที่ใช้ในการทดลองให้เริ่มต้นที่ 0.5 McFarland เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมวิธีการกระตุ้นโดยถ่ายเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ลงใน หลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่มียาความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังกล่าวข้างต้นปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบ/นาทีที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ปริมาณ 9 มิลลิลิตร และเลี้ยงใน สภาวะเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นนี้ทุกวัน จนกระทั่งถึงวันที่ 60 นับจากวันแรกที่ถ่ายเชื้อ เก็บเชื้อในวันที่ 0 (วันแรก) 15 30 50 และ 60 วัน เพื่อนำมาทดสอบ

ค่า MIC ด้วยวิธี Microdilution test (ตามวิธีในข้อ 3) สกัดดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ (ตามวิธีในข้อ 4 และ 5 ตามลำดับ) ทุกขั้นตอนมีการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

ตาราง 3 แสดงผลการเตรียมความเข้มข้นของยา fluconazole เป็น ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (มก./มล.) ในการกระตุ้นเชื้อ *C. albicans* (0.5 McFarland) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RPMI 1640

ลำดับที่	อาหารเหลว RPMI 1640 (มล.)	ปริมาณ <i>C. albicans</i> (มล.)	ความเข้มข้นยา/ ปริมาณยา (มก./มล./มล.)*	ความเข้มข้นสุดท้ายของยา (มก./มล.)	ปริมาตรรวม (มล.)
1	4.5	0.5	-	-	5.0
2	4.0	0.5	80	8	5.0
3	4.0	0.5	160	16	5.0
4	4.0	0.5	320	32	5.0
5	4.0	0.5	640	64	5.0

* เติมปริมาณยา 0.5 มิลลิตรลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว RPMI 1640 จำนวน 4.0 มิลลิตรและเชื้อจำนวน 0.5 มิลลิตร

3. การทดลองเพื่อหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

การเตรียม stock solution ของยา fluconazole

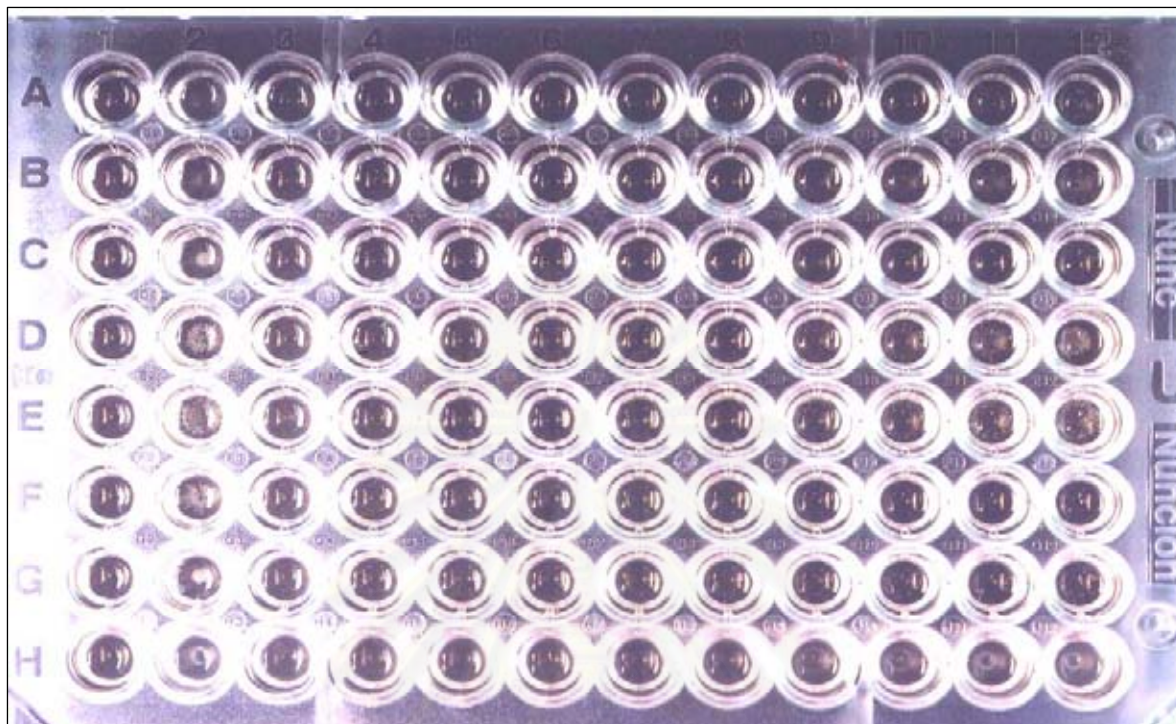
เตรียม stock solution ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ยาที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ทดสอบ เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการทดลองหาค่า MIC จึงนำ stock solution มาเจือจางเป็น 10 เท่า การเตรียมยาและการทดสอบหาค่า MIC ทำตามวิธีมาตรฐานของ NCCLS – M27 – A (43) ความเข้มข้นสุดท้ายของ fluconazole ที่ใช้ในการทดสอบ คือ 0.125 0.25 0.5 1 2 4 8 16 32 และ 64 ไมโครกรัม/มิลลิตร

ยาบริสุทธิ์ของ fluconazole ได้รับอนุญาตจาก รศ.ดร.อุทัย สุวรรณภู ณะเกษัช ศาสตราจารย์ภาควิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบริษัทสยามฟาร์มาซูติคอล จำกัด

การหาค่า MIC ด้วย Microdilution Broth technique (43)

เป็นการทดลองหาค่า MIC ใน microtiter plate โดยปั่นล้างเชื้อทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ณ วันต่าง ๆ ที่ได้เก็บไว้ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2 ครั้ง และปรับความเข้มข้นของเชื้อให้เป็น 1.5×10^6 CFU หรือ 0.5 McFarland ใน 0.85% NaCl จากนั้นทำการเจือจางอีก 1:50 ด้วย 0.85% NaCl เมื่อจะทดสอบหา MIC จะเชื้อเจือจางลงไปอีก 1:20 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RPMI 1640 เพื่อให้ได้เชื้อที่มีปริมาณเป็น $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ CFU/ml (working inoculum)

วิธีการทดลอง เติม working inoculum ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใน well ของ microtiter plate และเติมยา fluconazole ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.125 0.25 0.5 1 2 4 8 16 32 และ 64 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยมีกลุ่มควบคุม คือ ตรวจสอบ sterility ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RPMI 1640 ตรวจสอบ sterility ของยา การเจริญของเชื้อโดยปราศจากยา และควบคุมคุณภาพของยาทดสอบโดยใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *C. parapsilosis* ATCC 22019 ควบคุมไปด้วย ซึ่งค่า MIC ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานนี้จะต้องมีค่าระหว่าง 2 – 8 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (รูป 8)



รูป 8 การหาค่า MIC ด้วย Microdilution technique ใน microtiter plate Well A1, B1, C1, ... H1 เป็นการควบคุมการทดลองและตรวจสอบ sterility ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RPMI 1640 Well A2, B2.....H2) เป็นการควบคุมการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ที่ไม่มี fluconazole เพื่อใช้เป็นการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในการอ่านค่า MIC ในแถว 3 ถึง 12 ที่เป็นเชื้อกลุ่มทดลอง โดยแถวที่ 3 ถึง 12 มีเชื้อในอาหาร RPMI 1640 มี fluconazole ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.125 0.25 0.5 1 2 4 8 16 32 และ 64 ไมโครกรัม / ไมโครลิตร ตามลำดับ

4. การเตรียม DNA ของเชื้อ *C. albicans*

เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB เขย่าที่ 140 รอบ/นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง ที่ 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสกัด DNA ด้วยชุด Wizard™ Genomic DNA Purification system (Bio-Rad, USA.) โดยดัดแปลงจากวิธีในคู่มือของชุดสกัด ดังนี้ คือ ใส่ sterile glass beads ใน eppendorf ที่มีเชื้อที่ปั่นล้างแล้วในอัตราส่วน 1:1 เติม lysis buffer ปริมาณ 300 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex นาน 10 นาที สลัดกับแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที ประมาณ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำไป spin ชุดของเหลวส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม lysis buffer ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ แล้วเติม nuclei lysis buffer ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ เติม

protein precipitate buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ cold isopropanol ปริมาณเป็น 2.5 เท่า เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำมาปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที และล้างตะกอนขาวด้วย cold 98% absolute ethanol, air dry นำมาละลายด้วย 1x TE buffer เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม RNA ของเชื้อ *C. albicans*

เลี้ยงเชื้อที่ได้หลังจากผ่านการกระตุ้นด้วยยาแล้วใน flask ที่มี SDB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าที่ 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเก็บเชื้อและล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตกตะกอน RNA โดยการเติม sodium acetate buffer ปริมาณ 10 มิลลิลิตร, 10% SDS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ hot saturated phenol in sodium acetate buffer ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอุ่นใน waterbath ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สลับกับ vortex 30 วินาที ทำจนครบ 5 นาที จึงแช่ใน Ethanol ice bath ทันที ปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คุณเฉพาะของเหลวส่วนล่างทิ้งไปเท่านั้น ทำการตกตะกอนซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วจึงดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ chloroform ด้วยอัตราส่วน 1:1 vortex อีก 2 นาที จึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ chloroform : isoamyl (24:1) ลงไปอัตราส่วน 1:1 ปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมน้ำ 3M sodium acetate ด้วยอัตราส่วน 1/10 และ 2.5 เท่าของ cold isopropanol เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงถึงข้ามคืน นำมาปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 25 นาที จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง ใช้ pipette ดูดของเหลวให้หมด แล้วจึงเติม 3 M sodium acetate และ cold isopropanol อีกครั้ง นำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน นำมาปั่นด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป ปั่นล้างอีกครั้งด้วยน้ำยา 98% cold absolute ethanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทส่วนใสทิ้งให้หมด ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ที่ treated ด้วย DEPC ปริมาณ 30 – 50 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ด้วย เครื่อง spectrophotometer (SmartSpec™ 3000 , Bio – Rad, USA) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เก็บ RNA ที่ได้ไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส

6. การสังเคราะห์ cDNA และ ปฏิกริยาลูกโซ่ reverse – transcription PCR (RT – PCR)

นำ RNA ที่เตรียมไว้ข้างต้นมา treated ด้วย DNase RQ1 (Promega, USA) เพื่อให้ได้ RNA ที่ปราศจาก DNA (DNA-free RNA) ปริมาณ 2 ไมโครกรัม ตามวิธีดังต่อไปนี้

DNase RQ1 condition

RNA in TE buffer	3	ไมโครกรัม
RQ1 RNase – Free DNase 10x reaction buffer	3	ไมโครลิตร
RQ1 RNase-Free DNase	3	ไมโครลิตร
Nuclease-free water to a final volume of	10	ไมโครลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำยา RQ1 DNase stop solution ปริมาณ 3 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำ DNA-free RNA ที่ได้มาทำ RT – PCR ด้วย RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA) โดยการดัดแปลงจากคู่มือปฏิบัติการของชุด kit ตามขั้นตอน ดังนี้

RT – PCR conditon

Total DNA – free RNA	2	ไมโครกรัม
oligo(dT)18 primer (0.5 ug/ul)	1	ไมโครลิตร
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20U/ul)	1	ไมโครลิตร
5x reaction buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	2	ไมโครลิตร
M – MuLV Reverse Transriptase (200 U/ul)	1	ไมโครลิตร
เติม DEPC-treated water ให้เป็น	20	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันและปั่นตก บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วต่อด้วย 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้ PCR product

7. การเพิ่มจำนวนยีน *ERG11 CDR1 CDR2 MDR1* และ *TAC1* ของเชื้อ *C. albicans*

อาศัยวิธีการทำปฏิกริยาลูกโซ่ พีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) สำหรับ primer ที่ใช้มีรายละเอียด ดังตาราง 4

ชิ้น *ERG11* (ความยาว 1.6 กิโลเบส)

PCR reaction (ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย

DNA template	1	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	5	ไมโครลิตร
10 mM dNTP	2	ไมโครลิตร
5 pmol of each primer	1	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.5	ไมโครลิตร
Distilled water	9.5	ไมโครลิตร

PCR condition

Stage 1 : 95 C	1	นาที	1 รอบ
Stage 2 : 95 C	1	นาที	} 35 รอบ
: 65 C	1	นาที	
: 72 C	2	นาที	
Stage 3 : 72 C	10	นาที	

ชิ้น *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* และ *TAC1* (ความยาว 2.4, 3.5, 3.6, และ 1.8 กิโลเบส ตามลำดับ)

PCR reaction (ปริมาตรทั้งหมด 30 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย

DNA template	1.5	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	3	ไมโครลิตร
25 mM dNTP	2.4	ไมโครลิตร
30 pmol of each primer	0.2	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.2	ไมโครลิตร
Distilled water	22.5	ไมโครลิตร

PCR condition

Stage 1 : 94 C	2	นาที	1 รอบ
Stage 2 : 94 C	40	วินาที	} 45 รอบ
: 55 C	30	วินาที	
: 72 C	3	นาที	
Stage 3 : 72 C	10	นาที	

ทำการตรวจสอบขนาด PCR products ที่ได้ด้วยการ run บน 1% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง Gel doc รุ่น 2000 (Biorad, USA.)

ตาราง 4 รายชื่อ primer ที่ใช้ในการทำ PCR

Primers	Sequences
<i>ERG11</i> :	
CaERG2 Forward	5' – TCATAACTCAATATGGCTATTGTTG – 3'
CaERG3 Reverse	5' – GAAAGTTGCCGTTTTATTA AACATAC – 3'
<i>MDR1</i> :	
MDR1 Forward	5' – ACCTAAGATTTTGCCTCGG – 3'
MDR1 Reverse	5' – GATGAAACCCAACACGGA ACTACC – 3'
<i>TAC1</i> :	
TAC1 Forward	5' – ATGGACGCTTCACTGTC ACTGGGA – 3'
TAC1 Reverse	5' – AGCACAGGTCGTT CACCAGCAAC – 3'

8. การหาลำดับเบสยีน *ERG11*

Purify PCR product ของยีนที่เตรียมไว้ด้วย QIAamp DNA purification kit (Qiagen, USA) ตามคำแนะนำในคู่มือของชุดทดสอบ จากนั้นนำไปหาลำดับเบสโดยใช้ ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit primer แสดงในตาราง 5

ตาราง 5 รายชื่อ primer ที่ใช้ในการทำ *ERG11* Sequencing

Primers	Sequences
CaERG11 - 01	5' – TTAGGTCCAAAAGGTC – 3'
CaERG11 - 02	5' – CATGACCTTTTGGACC – 3'
CaERG11 - 03	5' – GACCGTTCATTTGCTC – 3'
CaERG11 - 04	5' – GAGCAAATGAACGGTC – 3'
CaERG11 - 05	5' – ATTCTTATGGGTGGTC – 3'
CaERG11 - 06	5' – GCAGAAGTAGAAGCAC – 3'
CaERG11 - 07	5' – TCTCCAGGTTATGCTC – 3'
CaERG11 - 08	5' – CCCATCTAGTTGGATC – 3'

ผลการวิจัย (Result)

การคัดเลือกและการเตรียมเชื้อ *C. albicans*

เชื้อ *C. albicans* ที่แยกได้จากรอยโรคในช่องปากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV ที่มีอาการ OPC ร่วมด้วย มีจำนวน 6 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบความไวรับต่อยา fluconazole ด้วยวิธี Etest ได้ผลดังแสดงในตาราง 6 พบว่า เชื้อมีความไวรับ (Susceptible strain) จำนวน 1 สายพันธุ์ เชื้อที่มีแนวโน้มที่จะดื้อต่อยา (Susceptible – dose dependent strain) จำนวน 1 สายพันธุ์ และเชื้อที่ดื้อต่อ (Resistance strain) จำนวน 4 สายพันธุ์ ในการศึกษานี้เลือกสายพันธุ์ K44.1 เป็นเชื้อที่มีความไวรับต่อยา fluconazole และ K39.1 เป็นเชื้อดื้อต่อยา (Resistance control)

เนื่องจากการทดลองนี้ ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการหาค่า MIC ด้วยวิธี Microdilution test พบว่าค่า MIC ของ K44.1 มีค่าเท่ากับ 2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ K39.1 มีค่าเท่ากับ >256 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

การกระตุ้น *C. albicans* ด้วยยา fluconazole

จากการกระตุ้น single cell ของสายพันธุ์ K44.1 และเชื้อจำนวน 25 สายพันธุ์ (No. 1-25, ตาราง 7) พบว่า ค่า MIC มีการเปลี่ยนแปลงจาก 2 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เป็น 32 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร คิดเป็น 16 เท่าจากค่าเริ่มต้นในทุกกลุ่มทดลอง หลังจากการกระตุ้นด้วยยา fluconazole ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลานาน 15 วัน การเปลี่ยนแปลงของค่า MIC มีค่าคงที่จนถึงวันที่ 60 ของการทดลอง ยกเว้นในกลุ่มที่ 5 ที่กระตุ้นเชื้อด้วยยาความเข้มข้น 64 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร พบว่า ค่า MIC สูงขึ้นเป็น 2 เท่าจาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 6 ค่า MIC ของ *C. albicans* ที่แยกได้จากช่องปากผู้ป่วยติดเชื้อ HIV เมื่อศึกษาด้วยวิธี Etest

Strains of <i>C. albicans</i>	ค่า MIC (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	การแปลค่า MIC
K39.1	>256	Resistance
K44.1	8	Susceptible
K49.1	48	S-DD*
K51.1	96	Resistance
K54.1	>256	Resistance
K78.1	>256	Resistance

*Susceptible – Dose Dependent (มีแนวโน้มที่จะดื้อยาที่ใช้ทดสอบ)

ค่า MIC ที่เพิ่มขึ้น คือ จาก 32 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เป็น 64 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (2 ใน 5 single cells, ร้อยละ 40) หลังจากการกระตุ้นนาน 50 วัน สำหรับกลุ่มที่ 3 ที่กระตุ้นเชื้อด้วยยาที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร พบว่า มี 1 ตัวอย่าง ที่ค่า MIC สูงขึ้นเป็น 64 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตั้งแต่วันที่ 30 ของการกระตุ้น (1/5 single cell, 20%) แต่ในวันที่ 50 ของการกระตุ้น พบว่าค่า MIC ลดลงเป็น 32 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มทดลองที่ 4 (1/5 single cell, 20%)

เชื้อที่ถูกกระตุ้นหลัง 60 วัน ดังตาราง 7 ถูกนำมาทดสอบความเสถียร (Stability) ของการดื้อยา พบว่าเชื้อทุกกลุ่มมีความเสถียร คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงกลับไปหาค่า MIC ก่อนการกระตุ้น

การวิเคราะห์ลำดับเบส *ERG11*

การศึกษาลำดับเบสของยีน *ERG11* จาก DNA และ cDNA ของเชื้อเดียวกัน จากเชื้อ wild type ที่เป็นสายพันธุ์ดื้อยา (resistance wildtype strain) K39.1 และสายพันธุ์ที่มีความไวรับต่อยา (susceptible wildtype strain) K44.1 และสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงค่า MIC หลังจากถูกกระตุ้นด้วยยา ได้แก่ 11D30 (single cell no. 11 จากกลุ่มที่ 3 ที่กระตุ้นแล้ว 30 วัน) 11D50 (single cell no. 11 จากกลุ่มที่ 3 ที่กระตุ้นแล้ว 50 วัน) 23D30 (single cell no. 23 จากกลุ่มที่ 5 ที่กระตุ้นแล้ว 30 วัน) และ 23D50 (single cell no. 23 จากกลุ่มที่ 5 ที่กระตุ้นแล้ว 50 วัน) ทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ เริ่มด้วยการทำ PCR ปรากฏว่า PCR product ที่ได้มีขนาดประมาณ 1.6 กิโลเบส (รูปที่ 8) ทำ

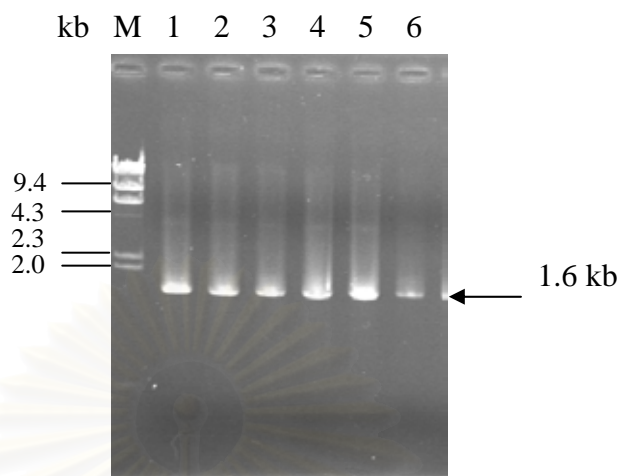
การ sequence PCR product ที่ได้ด้วย primers ที่กล่าวมาแล้วในตาราง 5 ผลของลำดับเบสของเชื้อแต่ละตัวแสดงอยู่ใน Appendix; complete sequence เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบพบว่า มีการเปลี่ยนลำดับเบส Thymine (T) เป็น Cytosine (C)(ตาราง 8)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 7 แสดงค่า MIC ของเชื้อในกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) และกลุ่มทดลอง (กลุ่มที่ 2 – 5) ที่กระตุ้นด้วยยา fluconazole ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 8 16 32 และ 64 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (มก./มล.) เป็นเวลานาน 60 วัน โดยตัวอย่างที่ใช้เป็นเชื้อที่เจริญจาก เซลล์เดี่ยวของสายพันธุ์ K 44.1

กลุ่มทดลองที่	วัน*	ค่า MIC ที่วัดได้ในแต่ละ 2 ช่วงเวลาที่ทำการเลี้ยง (มก./มล.)				
		0	15	30	50	60
กลุ่มที่ 1 : ความเข้มข้นสุดท้าย = 0 มก./มล.						
No. 1		2	2	2	2	2
No. 2		2	2	2	2	2
No. 3		2	2	2	2	2
No. 4		2	2	2	2	2
No. 5		2	2	2	2	2
กลุ่มที่ 2 : ความเข้มข้นสุดท้าย = 8 มก./มล.						
No. 6		2	32	32	32	32
No. 7		2	32	32	32	32
No. 8		2	32	32	32	32
No. 9		2	32	32	32	32
No. 10		2	32	32	32	32
กลุ่มที่ 3 : ความเข้มข้นสุดท้าย = 16 มก./มล.						
No. 11		2	32	64	32	32
No. 12		2	32	32	32	32
No. 13		2	32	32	32	32
No. 14		2	32	32	32	32
No. 15		2	32	32	32	32
กลุ่มที่ 4 : ความเข้มข้นสุดท้าย = 32 มก./มล.						
No. 16		2	32	32	32	32
No. 17		2	32	32	32	32
No. 18		2	32	64	32	32
No. 19		2	32	32	32	32
No. 20		2	32	32	32	32
กลุ่มที่ 5 : ความเข้มข้นสุดท้าย = 64 มก./มล.						
No. 21		2	32	32	32	32
No. 22		2	32	32	64	64
No. 23		2	32	32	64	64
No. 24		2	32	32	32	32
No. 25		2	32	32	32	32



รูปที่ 9 แสดงขนาด PCR product ของยีน *ERG11* จาก template cDNA; lane M = marker (λ *Hind*III) lane 1 – 6 = PCR product ของ 11D30 11D50 23D30 23D50 K44.1 และ K39.1 ตามลำดับ (kb = กิโลเบส)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 8 แสดง point mutation ของยีน *ERG11* ในเชื้อแต่ละตัว

ชื่อ	Sequence
K39.1	ATG AAG ATT TAC AAA AAT TAC CAT CAG TCA ATA ACA CTA TTA AGG AAA CTC TTA GAA TGC ATA TGC CAT TAC ATT CTA TTT TTA GAA AAG TTA CTA ACC CAT TAA
K44.1	ATG AAG ATT TAC AAA AAT TAC CAT CAG TCA ATA ACA CTA TTA AGG AAA CTC TCA GAA TGC ATA TGC CAT TAC ATT CTA TTT TTA GAA AAG TTA CTA ACC CAT TAA
11 D30	ATG AAG ATT TAC AAA AAT TAC CAT CAG TCA ATA ACA CTA TTA AGG AAA CTC TCA GAA TGC ATA TGC CAT TAC ATT CTA TTT TTA GAA AAG TTA CTA ACC CAT TAA
11 D50	ATG AAG ATT TAC AAA AAT TAC CAT CAG TCA ATA ACA CTA TTA AGG AAA CTC TCA GAA TGC ATA TGC CAT TAC ATT CTA TTT TTA GAA AAG TTA CTA ACC CAT TAA
23D30	ATG AAG ATT TAC AAA AAT TAC CAT CAG TCA ATA ACA CTA TTA AGG AAA CTC TCA GAA TGC ATA TGC CAT TAC ATT CTA TTT TTA GAA AAG TTA CTA ACC CAT TAA
23D50	ATG AAG ATT TAC AAA AAT TAC CAT CAG TCA ATA ACA CTA TTA AGG AAA CTC TCA GAA TGC ATA TGC CAT TAC ATT CTA TTT TTA GAA AAG TTA CTA ACC CAT TAA

จากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสดังกล่าวนั้นเมื่อนำไป translate เป็น amino acid ของยีน *ERG 11* ด้วยโปรแกรม Expsy translate tool (44) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลง amino acid บนยีนนั้น คือการเปลี่ยนจาก T ไปเป็น C ทำให้เปลี่ยน amino acid จาก Leucine (L) ไปเป็น Serine (S) ดังแสดงในตาราง 9 (Appendix; complete amino acid sequence)

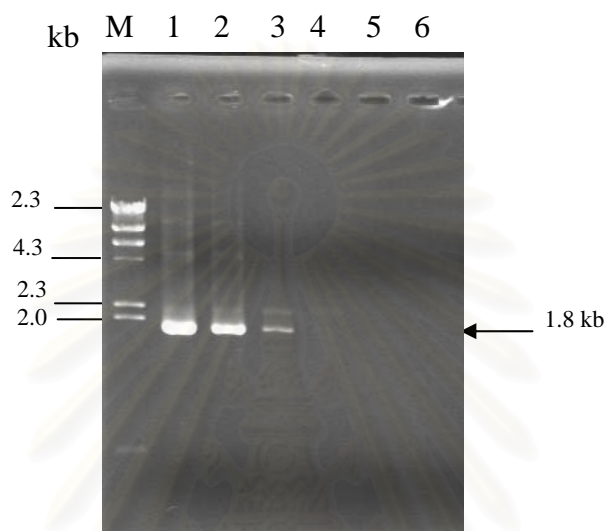
ตาราง 9 แสดงการเปลี่ยนแปลง amino acid ที่เกิดจาก point mutation ของยีน *ERG 11*

Strains	Amino acid Sequence
K39.1	Met K I Y K N Y H Q S I T L L R K L S E C I C H Y I L F L E K L L T H Stop
K44.1	Met K I Y K N Y H Q S I T L L R K L S E C I C H Y I L F L E K L L T H Stop
11 D30	Met K I Y K N Y H Q S I T L L R K L S E C I C H Y I L F L E K L L T H Stop
11 D50	Met K I Y K N Y H Q S I T L L R K L S E C I C H Y I L F L E K L L T H Stop
23 D30	Met K I Y K N Y H Q S I T L L R K L S E C I C H Y I L F L E K L L T H Stop
23 D50	Met K I Y K N Y H Q S I T L L R K L S E C I C H Y I L F L E K L L T H Stop

การศึกษาการแสดงออกของยีน *MDR1 CDR1 CDR2* และ *TAC1*

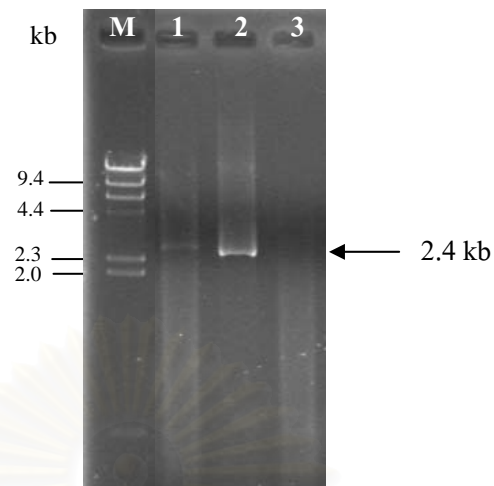
การศึกษาการแสดงออกของยีน ศึกษาทั้งในเชิงคุณภาพ (qualitative) และ เชิงกึ่งปริมาณ (semi – quantitative) ในเชิงคุณภาพ เป็นการศึกษาว่า ยีน *MDR1 TAC1 CDR1* และ *CDR2* มีการแสดงออกของหน้าที่หรือไม่ โดยใช้ปฏิกิริยา RT-PCR และในปฏิกิริยาดังกล่าวมี template cDNA ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งได้จากการทดสอบความไวด้วยการตรวจสอบความเข้มของ band cDNA หลังจาก run electrophoresis ปรากฏว่า ความเข้มข้นของ cDNA ของยีน *MDR1 CDR1* และ *CDR2* มีค่าประมาณ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อ PCR reaction) ในขณะที่ความเข้ม cDNA ของยีน *TAC1* มีค่าประมาณ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อ PCR reaction) (รูป 9) ในเชิงคุณภาพ เป็นการสังเกต density ของ PCR product band ด้วยการ ใช้ Quality One Program (Bio – Rad) เปรียบเทียบระหว่างยีนเดียวกันในสายพันธุ์ต่างกัน ผลการทดลองพบว่า ยีน *MDR1* มีการแสดงออกในสายพันธุ์ที่มีค่า MIC สูงขึ้นหลังจากการกระตุ้นด้วยยา ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 16 และ 64 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ด้วยเวลาที่ต่างกัน คือ สายพันธุ์ 11 D30 11 D50; 23 D30 23 D50 (ตาราง 7) มี density ระหว่าง 148.06 – 180.34 (ตาราง 10) และมีความยาว 2.4 kb (รูป 10) สำหรับยีน *TAC1* ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcriptional factor ของยีน *CDR1* และ *CDR2* นั้น มีความยาว 1.8 กิโลเบส (รูป 11) และมีการแสดงออกในทุกสายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ 11 D50 โดย density มีค่าอยู่ระหว่าง 105.3 – 184.12 (ตาราง 10) การแสดงออกของยีนนี้ในสายพันธุ์เดียวกันไม่ได้ขึ้นกับระยะเวลาที่เชื้อถูกกระตุ้นด้วยยา ดังผลของ 11 D30 และ 11 D50 ส่วนผลของยีน 2 ยีนที่ *TAC1* ควบคุม คือ ยีน *CDR1* และ *CDR2* นั้น พบว่า *CDR1* มีความยาว 3.4 กิโลเบส (รูป 12) และมีการแสดงออกในสายพันธุ์ 11D50 23D50 และ susceptible wildtype เท่านั้น ด้วย density

ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 84.09 – 107.38 (ตาราง 10) อีกยีนหนึ่ง คือ ยีน *CDR2* มีความยาว 3.5 กิโลเบส (รูป 13) และมีการแสดงออกในทุกสายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ 11D30 และ resistance wildtype โดย density มีค่าอยู่ระหว่าง 96.9 – 114.77 (ตาราง 10)

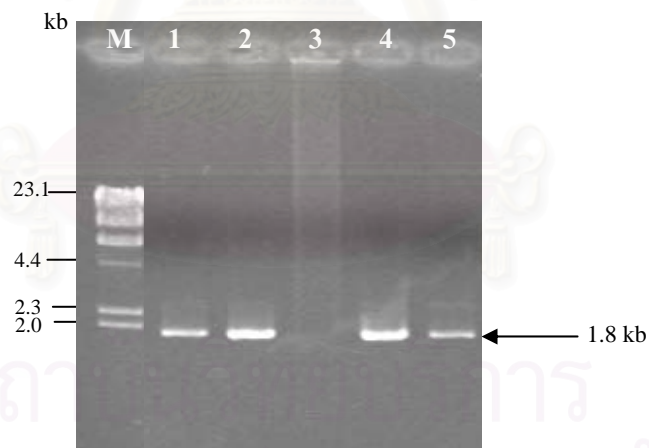


รูป 10 แสดงการทดสอบความไวของ template cDNA ในปฏิกิริยา PCR สำหรับยีน *TAC1* และขนาดของ PCR product : M = λ HindIII marker , lane 1– 6 เป็นความเข้มข้นของ cDNA ที่ 1,000, 100, 10, 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 100, 10, และ 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

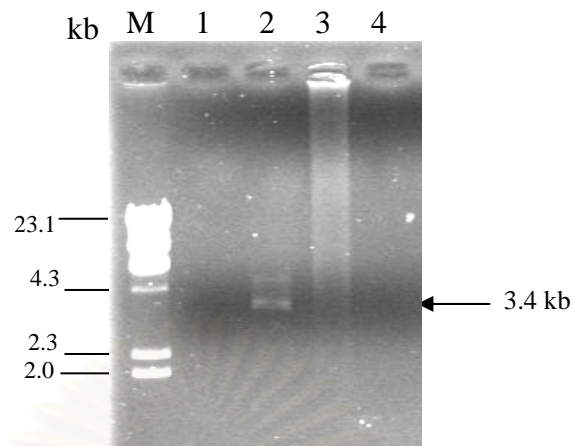
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



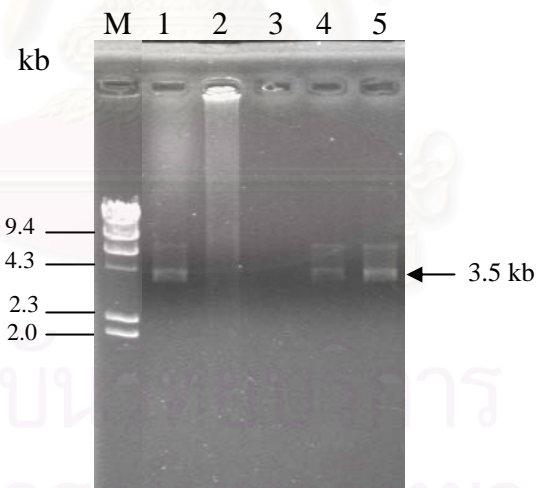
รูป 11 แสดงขนาดของ PCR product ของยีน *MDR1* จาก template cDNA; lane M = marker λ *Hind*III ในขณะที่ lane 1 และ 2 แสดงผลการทำ PCR จาก cDNA ของเชื้อ K39.1 และ K44.1 ที่ความเข้มข้นของ cDNA = 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับ lane 3 = negative control



รูป 12 แสดงขนาด PCR product ของยีน *TAC1* จาก template cDNA; lane 1 = marker λ *Hind*III ในขณะที่ lane 2 – 6 แสดงผลการทำ PCR จาก cDNA ของเชื้อ K39.1 23D30 11D30 11D50 23D50 และ K44.1 ที่ความเข้มข้นของ cDNA = 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 13 แสดงขนาด PCR product ของยีน *CDR1* จาก template cDNA; lane M = marker λ *HindIII* ในขณะที่ lane 1 – 4 แสดงผลการทำ PCR จาก cDNA ของเชื้อ K39.1 K44.1 11D30 และ 23D30 ที่ความเข้มข้นของ cDNA = 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูป 14 แสดงขนาด PCR product ของยีน *CDR2* จาก template cDNA; lane M = marker λ *HindIII* ในขณะที่ lane 1 – 5 แสดงผลการทำ PCR จาก cDNA ของเชื้อ K44.1 K39.1 11D30 11D50 และ 23D50 ที่ความเข้มข้นของ cDNA = 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตาราง 10 แสดงค่าความเข้มของ band (PCR product) ของยีน *MDR1* *TAC1* *CDR1* และ *CDR2* จากการใช้ template cDNA ที่มีความเข้มข้นเท่ากันในการทำปฏิกิริยา PCR

Strain/isolates	MIC (มก./มล.)	<i>MDR1</i>	<i>TAC1</i>	<i>CDR1</i>	<i>CDR2</i>
K39.1 ^o	>256	148.79	105.3	X	X
K44.1 ^o	8	172.46	106.92	88.21	107.14
11 D30*	64	148.06	105.3	X	X
23 D30**	32	180.34	159.54	X	96.9
11 D50***	32	179.97	X	84.09	114.77
23 D50****	64	163.35	184.12	107.38	105.27

^o K39.1 : wild type resistance strain

^o K44.1 : wild type susceptible strain

*11 D30 : สายพันธุ์ที่ได้จาก single cell no. 11 และกระตุ้นด้วยยาที่มีความเข้มข้น 16 มก./มล. นาน 30 วัน

**11 D50 : สายพันธุ์ที่ได้จาก single cell no. 11 และกระตุ้นด้วยยาที่มีความเข้มข้น 16 มก./มล. นาน 50 วัน

***23 D30 : สายพันธุ์ที่ได้จาก single cell no. 23 และกระตุ้นด้วยยาที่มีความเข้มข้น 64 มก./มล. นาน 30 วัน

****23 D50 : สายพันธุ์ที่ได้จาก single cell no. 23 และกระตุ้นด้วยยาที่มีความเข้มข้น 64 มก./มล. นาน 50 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิปรายผลและข้อสรุป (Discussion and Conclusion)

ในปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อที่เป็น azole – resistant strain เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV และได้รับการรักษาด้วยยากกลุ่ม azole เป็นระยะเวลานาน (45, 46) เท่าที่มีรายงานการศึกษา พบว่า สาเหตุของการดื้อยาเกิดเนื่องจากการทำงานร่วมกันของหลายกลไก (37, 40) เช่น overexpression หรือ mutation ของยีน *ERG11* *CDR1* *CDR2* และ *MDR1* ในการศึกษานี้ได้เลือกเชื้อจากผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีอาการของ OPC และมีประวัติการรักษาด้วยยาต้านเชื้อรากลุ่ม azole จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ K39.1 เป็น resistance wildtype และ K44.1 เป็น susceptible wildtype นอกจากนี้ค่า MIC ที่เปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับสถานะสิ่งแวดล้อม ซึ่งในการทดลองนี้ คือ ความเข้มข้นของยาและระยะเวลาในการกระตุ้นเชื้อ ซึ่งเปรียบได้กับสถานะที่อาจเกิดขึ้นในการรักษาในคนไข้ การศึกษานี้ได้กระตุ้นเชื้อ susceptible wildtype strain ให้กลายเป็น resistance strain โดยแสดงเป็นค่า MIC ที่เปลี่ยนแปลงไป ดังแสดงในตาราง 7 โดยอ้างอิงเกณฑ์ NCCLS ว่าค่า $MIC \leq 8$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น susceptible strain ค่า $MIC = 16 - 32$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น susceptible – dose dependent strain และ ค่า $MIC \geq 64$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น resistant strain (47) การทดลองหาค่า MIC ในที่นี้ มีสองวิธีและเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐาน คือ Etest กับ Microdilution test พบว่าค่า MIC ที่ได้จากวิธี Etest มีค่ามากเป็น 3 เท่าของค่า MIC ที่ได้จากวิธี Microdilution test ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Matar และคณะในปี 2003 (48) นอกจากนี้ เชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ คือ ใช้ single cell ที่มาจากสายพันธุ์เดียวกันเพื่อไม่ให้มีการแปรปรวนของประชากรเชื้อในแต่ละการทดลอง และจากผลการทดลองมีการแสดงให้เห็นว่า single cell ที่นำมาทดลองในยาที่มีความเข้มข้นเดียวกัน ก็ให้ผลที่แตกต่างกัน แสดงด้วยค่า MIC ในตาราง 7

ดังที่ทราบกลไกการดื้อยาเป็นผลสืบเนื่องจากการทำงานร่วมกันของยีนหลายตัว(16) ยีนที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ยีน *ERG11* *MDR1* *CDR1* *CDR2* และ *TAC1* สำหรับยีน *ERG11* มีหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ lanosterol 14 α – demethylase ใน ergosterol biosynthetic pathway มีรายงานการพบ point mutation หรือ hot spot หลายตำแหน่งของยีนส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนของ amino acid เช่น ตำแหน่ง R476K (21) ตำแหน่ง G129A ตำแหน่ง Y132H ตำแหน่ง S405F ตำแหน่ง G464S(49) ทำให้โครงสร้างเอนไซม์บริเวณที่จับกับยามีการเปลี่ยนแปลงมีผลทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ในการรักษาโรคได้ แต่ในการศึกษานี้ ลำดับเบสทั้งใน DNA และ cDNA ไม่มีความแตกต่างกันเป็นการยืนยันลำดับเบสเมื่อพิจารณา point mutation ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนและ amino acid ในยีน *ERG11* เมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ K44.1 wild type susceptible strain และ inducing strain กับ K39.1 wild type resistant strain พบว่า amino acid ที่ตำแหน่ง 421 คือ

Leucine (L) ซึ่งเป็น amino acid ชนิดเดียวกันกับใน susceptible *C. albicans* strain 6408/8(50) แต่ใน amino acid ของ K44.1 และกลุ่มที่ถูกกระตุ้น เป็น Serine (S) จะสังเกตได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ amino acid L421S น่าจะมีผลเกี่ยวกับกลไกการคือยาน้อยมาก และยังไม่มีการรายงานการเกิด point mutation ในตำแหน่งนี้ นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ตำแหน่ง 412 ในเชื้อจากการศึกษานี้ทั้งหมดเป็น Glutamine (Q) ขณะที่ *C. albicans* strain 6408/8 เป็น Arginine (R) ฉะนั้นบริเวณตำแหน่งนี้ไม่พบรูปแบบที่แน่นอนของ amino acid ทั้งใน susceptible และ resistance strain จึงอาจไม่ใช่ตำแหน่งสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกลไกการคือยาโดยตรง

สำหรับผลการศึกษายีน *MDR1* ในงานวิจัยครั้งนี้ สามารถตรวจพบ mRNA ของยีน *MDR1* ทั้งที่เป็น wild type และ inducing strain ดังแสดงในตาราง 11 และยังตรวจพบ mRNA ของยีน *CDR1* และ *CDR2* ในเชื้อบางสายพันธุ์ เช่น susceptible wild type strain: K44.1 และสายพันธุ์ที่กระตุ้นด้วยยาเป็นเวลานาน 50 วัน แต่ไม่พบ mRNA ของยีนทั้งสองใน resistance wild type strain : K39.1 ความไม่สัมพันธ์กันระหว่างการ express ของยีนกับการคือยาในการศึกษานี้เป็นในทำนองเดียวกับผลการศึกษาที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว (17)

ปี ค.ศ. 2004 มีรายงานการพบ transcriptional factor ที่จำเป็นในการ express ของยีน *CDR1* และ *CDR2* คือ ยีน *TAC1*(51) จึงเป็นยีนสำคัญที่ควรนำมาศึกษาร่วมกับยีน *CDR1* และ *CDR2* ในการศึกษานี้สามารถตรวจพบ mRNA ของยีน *TAC1* ในช่วงระยะเวลา 30 วัน และ 50 วัน ในเชื้อทุกสายพันธุ์ แสดงว่า ณ ช่วงเวลานั้นยีน *TAC1* ถูกกระตุ้นให้มีการ express ของยีนมากขึ้น ยกเว้นในสายพันธุ์ที่ถูกกระตุ้นเป็นเวลานาน 50 วัน 1 สายพันธุ์ คือ 11D50 อย่างไรก็ตามปริมาณการ express ของทั้ง resistance wild type และ susceptible wild type ไม่พบความแตกต่าง แต่สิ่งที่น่าสนใจ คือ ใน inducing strain สายพันธุ์ 23 มี expression ของยีน *TAC1* มากกว่าสายพันธุ์อื่น และมี expression เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ ตามระยะเวลาของการถูกกระตุ้นด้วยยา (ตาราง 11) ซึ่งสอดคล้องกับค่า MIC ที่เพิ่มขึ้นจาก 32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

โดยสรุปเราสามารถจำลองการคือยาของเชื้อ โดยการกระตุ้นให้เชื้อคือยาทาง *in vitro* ได้ และค่า MIC ที่สูงขึ้นมีความเสถียร ไม่น้อยกว่า 30 วันหลังการกระตุ้นด้วยยา ผล expression ของยีน *MDR1* และ *TAC1* (ควบคุมการทำงานของยีน *CDR1* และ *CDR2*) ไม่พบความสอดคล้องกันกับการคือยา นอกจากนี้พบความหลากหลายของลำดับเบส (polymorphism) ในยีน *ERG11* ที่ไม่มีการรายงานมาก่อน ซึ่งต้องทำการทดลองเพื่อศึกษากลไกต่อไป

ข้อเสนอแนะ (Suggestion for Further Work)

1. ควรทำการพิสูจน์ต่อไปว่า inducible single cell ที่มีค่า MIC ต่างกันและคงที่นั้น มีผลสืบเนื่องจากลำดับเบสและการแสดงออกของยีนอย่างไร โดยทำการศึกษาด้วยการเพิ่มจำนวนเชื้อที่เป็น single cell ที่มีค่า MIC ต่างกันในแต่ละช่วง และนำไปศึกษาทั้งลำดับเบสและการแสดงออกของ putative gene : *ERG3*, *ERG11*, *MDR1*, *CDR1*, *CDR2* และ *TAC1*
2. ศึกษา function ของแต่ละยีน เช่น อาศัยหลักการ RNAi เป็นต้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนอ้างอิง (References)

1. Cernicka J, Subik J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 May;27(5):403-8.
2. www.doctorfungus.org.
3. Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol*. 2002 Aug;5(4):379-85.
4. Williamson S. "Production of Amphotericin B". 2002.
5. Saag MS, and W. E. Dismukes. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32:1-8.
6. Hitchcock CA. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem Soc Trans*. 1993 Nov;21(4):1039-47.
7. Demain AL, Zhang, L. *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutics Medicines*: Humana Press, Totowa, NJ; 2005.
8. <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluconazole>. 2006.
9. Antoniadou A, H. A. Torres, R. E. Lewis, J. Thornby, G. P. Bodey, J. P. Tarrand, X. Y. Han, K. V. Rolston, A. Safdar, I. I. Raad, and D. P. Kontoyiannis. Candidemia in a tertiary care center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. *Medicine*. 2003;82:301-21.
10. Arikan S, M. Akova, M. Hayran, O. Ozdemir, M. Erman, D. Gur, and S. Unal. Correlation of in vitro fluconazole susceptibility with clinical outcome for severely ill patients with oropharyngeal candidiasis. *Clin Infect Dis*. 1998;26:903-8.
11. Cameron ML, W. A. Schell, S. Bruch, J. A. Bartlett, H. A. Waskin, and J. R. Perfect. Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:2449-53.
12. Cartledge JD, J. Midgley, M. Petrou, D. Shanson, and B. G. Gazzard. Unresponsive HIV-related oro-oesophageal candidosis—an evaluation of two new in-vitro azole susceptibility tests. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40:517-23.

13. Rodriguez-Tudela JL, J. V. Martinez-Suarez, F. Dronda, F. Laguna, F.Chaves, and E. Valencia. Correlation of in-vitro susceptibility test results with clinical response: a study of azole therapy in AIDS patients. *JAntimicrob Chemother.* 1995;35:793-804.
14. Takakura S, N. Fujihara, T. Saito, T. Kudo, Y. Inuma, S. Ichiyama, and The Japan Invasive Mycosis Surveillance Study Group. Clinical factors associated with fluconazole resistance and short-term survival in patients with Candida bloodstream infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:380-8.
15. Walmsley S, S. King, A. McGeer, Y. Ye, and S. Richardson. Oropharyngeal candidiasis in patients with human immunodeficiency virus: correlation of clinical outcome with in vitro resistance, serum azole levels, and immunosuppression. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1554-61.
16. Akins RA. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2005 Jun;43(4):285-318.
17. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Jun;46(6):1704-13.
18. Morschhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jul 18;1587(2-3):240-8.
19. THEODORE C. WHITE KAMARAB. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS.*, 1998;11(2):382-402.
20. Sanglard D, K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod, and J. Bille. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2378-86.
21. White TC. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14-alpha-demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:1488-94.
22. www.hivwebstudy.org. 2006.
23. Sanglard D IF, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology.* 1997;143(pt2):405-416.

24. Nakamura K NM, Niimi K, et al . Functional expression of *Candida albicans* drug efflux pump Cdr1p in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:3366-74.
25. Schuetzer-Muehlbauer M WB, Egner R, Ecker G, Kuchler K. Reversal of antifungal resistance mediated by ABC efflux pumps from *Candida albicans* functionally expressed in yeast. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22:291-300.
26. Prasad R, De Wergifosse P, Goffeau A, Balzi E. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet.* 1995 Mar;27(4):320-9.
27. Prasad R, Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol.* 2005;242:215-48.
28. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell.* 2004 Dec;3(6):1639-52.
29. De Deken X, Raymond M. Constitutive activation of the PDR16 promoter in a *Candida albicans* azole-resistant clinical isolate overexpressing CDR1 and CDR2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jul;48(7):2700-3.
30. Karababa M, Coste AT, Rognon B, Bille J, Sanglard D. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Aug;48(8):3064-79.
31. Rustad TR, Stevens DA, Pfaller MA, White TC. Homozygosity at the *Candida albicans* MTL locus associated with azole resistance. *Microbiology.* 2002 Apr;148(Pt 4):1061-72.
32. Alix Coste VT, Françoise Ischer, Joachim Morschhäuser, Anja Forche, Anna Selmecki, Judith Berman, Jacques Bille and Dominique Sanglard. A Mutation in Tac1p, a Transcription Factor Regulating CDR1 and CDR2, Is Coupled With Loss of Heterozygosity at Chromosome 5 to Mediate Antifungal Resistance in *Candida albicans*. *Genetics.* 2006;172:2139–56.
33. Rao VV, Chiu ML, Kronauge JF, Piwnicka-Worms D. Expression of recombinant human multidrug resistance P-glycoprotein in insect cells confers decreased accumulation of technetium-99m-sestamibi. *J Nucl Med.* 1994 Mar;35(3):510-5.

34. Ktitorova OV, Kakpakova EC, Vinogradova MM, Il'ina EN, Govorun VM, Zabolina TN, et al. [Relationship between the induction of MDR1, a multidrug resistance gene in tumor cells, and apoptosis]. *Ontogenez*. 2001 Jul-Aug;32(4):295-301.
35. Wirsching S, Michel S, Morschhauser J. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol*. 2000 May;36(4):856-65.
36. Wirsching S, Michel S, Kohler G, Morschhauser J. Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol*. 2000 Jan;182(2):400-4.
37. White TC. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Jul;41(7):1482-7.
38. FG. CMaR. Antifungal drug resistance to azole and polyene. *The Lancet infectious diseases* 2002;2:550-63.
39. E. Pinjon GPM, D.C. Coleman and D.J. Sullivan. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochemical Society Transactions*. 2005;33:1210-4.
40. Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Lee LN, Kirkpatrick WR, White TC, Sanglard D, et al. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Nov;42(11):2932-7.
41. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Oct;40(10):2300-5.
42. Perea S, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Oct;45(10):2676-84.
43. Galgiani JN BM, Ghannoum MA, Espinel - Ingroff A, Lancaster MV, Odds FC, Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG and Walsh TJ. Reference Method for Broth Dilution Antifungal

Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard.: The National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1997.

44. <http://au.expsasy.org/tools/dna.html>.
45. Ghannoum MA, Rex, J.H., and Galgiani, J.N. Susceptibility testing of fungi: current status of correlation of in vitro data with clinical outcome. *J Clin Microbiol.* 1996;34:489-95.
46. Rex JH, Rinaldi, M.G., and Pfaller, M.A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1-8.
47. Rex JH, M. A. Pfaller, J. N. Galgiani, M. S. Bartlett, A. Espinel-Ingroff, M. A. Ghannoum, M. Lancaster, F. C. Odds, M. G. Rinaldi, T. J. Walsh, and A. L. Barry. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis.* 1997;24:235-47.
48. Matar MJ O-ZL, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of Fluconazole and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(5):1647 - 51.
49. Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Feb;42(2):241-53.
50. Lai MHaK, D.R. Nucleotide sequence of cytochrome P450 L1A1 (lanosterol 14 α -demethylase) from *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(2):804.
51. Coste AT, M. Karababa, F. Ischer, J. Bille and D. Sanglard,. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell.* 2004;3:1639-52.

ส่วนผนวก (Appendix)

Amino acid Sequence of *ERG11* gene

1. K39.1 (Resistance strain)

XNDYRHLILVA Stop CSQQISILLGVPFVYT Stop YGNIIYHIRKDRA
 PLVFWIPWFGSAASYGQQPYEFFESCRQKYGDVFSF Met LLGKI
 Met TVYLGPKGHEFVFNAKLL Met FLLK Met LISI Stop LLQFSVKGLF
 Met IVQILD Stop WNKKNLLNLL Stop LLHLKD Met FLRLEKKF Stop II
 LLL Met KVS N Stop KKKL Met GLP Met L Stop KLNQKLLFSLLDLYLV
 Met K Stop EEFLTVHLLNYILI Stop IKVLP LLILFSLIYLL ET Stop CCSK
 ENLCYLYYLIRKKLN Stop EENVVILIQIVI Stop LIPY Stop FIQLIK Met
 V Stop K Stop LIKKLLIF Stop LVFLWVVNILLLLLLLGSCYI Stop VKNL
 IYK Met LFIKKLLNC Stop KKKVVI Stop Met I Stop L Met KIYKNYHQ SITL
 LRKLEECICHYILFLEKLLTH Stop ESLKPIILFQKVI Met F Stop FLQV
 Met LILVKDILITLKILIQLDGILLPKLILFHLTLL Met KLIMet GLG
 KFLKGFLHLIYHLVVVDIDVLXNNLL Met FNWEPF Stop LLLFIT
 Stop DGLL Met VIKCLTLIIVQWWFYLLNQQKSF GKKEKLVCFNKR
 PTFK

2. K44.1 (Susceptible strain)

XQYEDYYFLSLSVTQQISILLGVPFVYNLWVQYLYSLRKDRAP
 LVFWIPWFGSAASYGQQPYEFFESCRQKYGDVFSF Met LLGKI
 Met TVYLGPKGHEFVFNAKLSDVSAEDAYKHLTTPVFGKGVYID
 CPNSRL Met EQKKFAKFA LT TDSFKRYVPKIREEILNYFVTDES F
 KLKEKTHGVANV Met KTQPEITIFTASRSLFGDEM Met RRIFDRSFA
 QLYSDLKGF TPINFVFPNLPLPHYWRRDAAQKKISATY Met KEI
 KLRRE RGDIDPNRDLIDSLLIHSTYKDGVK Stop LIKKLLIF Stop LV
 FLWVVNILLLLLLLGSCYI Stop VKNLIYK Met LFIKKLLNY Stop KK
 KVVI Stop Met I Stop L Met KIYKNYHQ SITLLRKLSE CICHYILFLEKL

LTH Stop ESLKPIILFQKVI Met F Stop FLQV Met LILVKDILITLKILIQLDGILLLPKLILFHLTLL Met KLIMet GLGKFLKGFLHLIYHLVVVDIDVLXNNLL Met FNWEPF Stop LLLFIT Stop DGLL Met VIKCLTLIIVQWWFYLLNQQKSFGKKEKLVCFNNGXNFQ

3. 11D30

GAWPXIIVXCVGLLPHXNQAVXHLG Stop XSRNSXCFXQNGNFQRKDRAPLVFYWIPWFGSAASYGQQPYEFFESCRQKYGDVFSF Met LLGKIMet TVYLGPKGHEFVFNAKLSDVSAEXAYXHLTTPVFGKGVYDCPNSRL Met EQKKFAKFALTTDSFKRYVPKIREEILNYFVTDESFKLKEKTHGVANVMet KTQPEITIFTASRSLFGDE Met RRIFDRSFAQLYSDLDKGFTPINFVFPNLPLPHYWRRDAAQRKXLLI Stop KKLN Stop EENVVILIQIVI Stop LIPY Stop FIQLIK Met V Stop K Stop LIKKLLIF Stop LVFLWVFNILLLLLLLGSCYI Stop VKNLIYK Met LFIKKLLNC Stop KKKVVI Stop Met I Stop L Met KIYKNYHQ SITLLRKLSEC ICHYILFLEKLLTH Stop ESLKPIILFQKVI Met F Stop FLQV Met LILVKDILITLKILIQLDGILLLPKLILFHLTLL Met KLIMet GLGKFLKGFLHLIYHLVVVDIDVLGNNLL Met FNWEPF Stop LLLFIT Stop DGLL Met VIKCLTLIIVQWWFYLLNQQKSFGKKEKLVCFNNRATF

4. 11D50

SL Met ALIIFCPLVLHNRSAILLGVFPVYNLVWQYLYSLRKDRAPLVFYWIPWFGSAASYGQQPYEFFESCRQKYGDVFSF Met LLGKIMet TVYLGPKGHEFVFNAKLSDVSAEXAYXHLTTPVFGKGVYDCPNSRL Met EQKKFAKFALTTDSFKRYVPKIREEILNYFVTDESFKLKEKTHGVANVMet KTQPEITIFTASRSLFGDE Met RRIFDRSFAQLYSDLDKGFTPINFVFPNLPLPHYWXTX Met LLKRKSLLLI Stop KKLN Stop EENVVILIQIVI Stop LIPY Stop FIQLIK Met V Stop K Stop LIKKLLIF Stop LVFLWVFNILLLLLLLGSCYI Stop VKNLIYK Met LFIKKLLNC Stop KKKVVI Stop Met I Stop L Met KIYKNYHQ SITLLRKLSEC ICHYI

LFLEKLLTH Stop ESLKPIILFQKVI Met F Stop FLQV Met LILVKDILIT
 LKILIQLDGILLLPKLILFHLTLL Met KLI Met GLGKFLKGFLHLIY
 HLVVVDIDVLGNNLL Met FNWEPF Stop LLLFIT Stop DGLL Met VIKC
 LTLIIVQWWFYLLNQQKSFGKKEKLVCFITRPPS

5. 23 D30

XSAWP Stop IIVXCVGCYLXGTSQ Stop IIWVXKRNSACFXQNGNFQ
 RKDRAPLVFYWIPWFGSAASYGQQPYEFFESCRQKYGDVFSF
 Met LLGKIMet TVYLGPKGHEFVFNAKLSDVSAEXAYXHLTTPVF
 GKGVIYDCPNSRL Met EQKKFAKFALT TDSFKRYVPKIREEILNY
 FVTDESFKLKEKTHGVANVMet KTQPEITIFTASRSLFGDE Met RR
 IFDRSFAQLYSDLDKGFTPINFVFPNLPLPHYWRRDAAQKKISA
 TY Met KEIKLRREL VILIQIVI Stop LIPY Stop FIQLIK Met V Stop K Stop LI
 KLLIF Stop LVFLWVVNILL LLL LLL GSCYI Stop VKNLIYK Met LFIK
 KLLNC Stop KKKVVI Stop Met I Stop L Met KIYKNYHQ SITLLRKLSECI
 CHYILFLEKLLTH Stop ESLKPIILFQKVI Met F Stop FLQV Met LILVKD
 ILITLKILIQLDGYCCCQS Stop FCFI Stop LF Stop Stop S Stop LWVWESF
 Stop RGGFTLFTIWWW Stop T Stop Met YWGTICLCSIXNHFN YFCL Stop
 LK Met DY Stop WL Stop SA Stop P Stop L Stop FNGGFTY Stop TSRNHLGKKR
 NLYVLIPXPF

6. 23 D50

XNI Stop GLLFFVLSVTNRSVYY Stop GFHLFTT Stop YGNIYIH Stop EK
 IELH Stop CFIGFLGLVLQLH Met VNNL Met NFSNHVVK S Met V Met YF
 HLCY Stop GKL Stop RFI Stop VQKV Met NLF S Met LNYL Met FLLK Met LIN
 I Stop LLQFSVKGLF Met IVQIPD Stop WNKKNLLNLL Stop LLHLKD
 Met FLRLEKKF Stop IILL Met KVS N Stop KKKL Met GLP Met L Stop KLNQ
 KLLFSLQDLYLV Met K Stop EEFLT VHLLNYILI Stop IKVLP LLILFS
 LIYLYLIIGDV Met LLKRK SLLI Stop KKL N Stop EENVVILIQIVI Stop
 LIPY Stop FIQLIK Met V Stop K Stop LIKLLIF Stop LVFLWVVNILL LLL

LLGSCYI Stop VKNLIYK Met LFIKKLLNC Stop KKKVVI Stop Met I Stop L
 Met KIYKNYHQ SITLLRKLSE CICHYILFLEKLLTH Stop ESLKPIIL
 FQKVIMet F Stop FLQVMet LILVKDILITLKILIQLDGILLPKLILFH
 L TLL Met KLIMet GLGKFLKGFLHLYHLVVVDIDVLGNLL Met FN
 Stop EPF Stop LLLFIT Stop DGLL Met VISA Stop P Stop L Stop FNGGFTY Stop
 TSRNHLGKKRNLYVLIKRPFQ



สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*Candida albicans*_strain_6408/8
 K39.1_ERG
 K44.1_ERG
 11.1d30
 11.1_d50
 23.2d30
 23.2D50

GTGGTGGTAGACATAGATGTATTGGGGAACAATTTGCTTATGTTCAATTG
 GTGGTGGTAGACATAGATGTATTGNGGAACAATTTGCTTATGTTCAATTG
 GTGGTGGTAGACATAGATGTATTGNGGAACAATTTGCTTATGTTCAATTG
 GTGGTGGTAGACATAGATGTATTGGGGAACAATTTGCTTATGTTCAATTG
 GTGGTGGTAGACATAGATGTATTGGGGAACAATTTGCTTATGTTCAATTG
 GTGGTGGTAGACATAGATGTATTGGGGAACAATTTGCTTATGTTCAATTG
 GTGGTGGTAGACATAGATGTATTGGGGAACAATTTGCTTATGTTCAATTA

*Candida albicans*_strain_6408/8
 K39.1_ERG
 K44.1_ERG
 11.1d30
 11.1_d50
 23.2d30
 23.2D50

GGAACCATTTTAACTACTTTTGTTTATAACTTAAGATGGACTATTGATGG
 GGAACCATTTTAACTACTTTTGTTTATAACTTAAGATGGACTATTGATGG
 GGAACCATTTTAACTACTTTTGTTTATAACTTAAGATGGACTATTGATGG
 GGAACCATTTTAACTACTTTTGTTTATAACTTAAGATGGACTATTGATGG
 GGAACCATTTTAACTACTTTTGTTTATAACTTAAGATGGACTATTGATGG
 GGAACCATTTTAACTACTTTTGTTTATAACTTAAGATGGACTATTGATGG
 GGAACCATTTTAACTACTTTTGTTTATAACTTAAGATGGACTATTGATGG

*Candida albicans*_strain_6408/8
 K39.1_ERG
 K44.1_ERG
 11.1d30
 11.1_d50
 23.2d30
 23.2D50

TTATAAAGTGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGGTTTTACCTACTG
 TTATAAAGTGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGGTTTTACCTACTG
 TTATAAAGTGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGGTTTTACCTACTG
 TTATAAAGTGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGGTTTTACCTACTG
 TTATAAAGTGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGGTTTTACCTACTG
 TTATAAAGTGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGGTTTTACCTACTG
 TTATAAAGTGCCTGACCCTGATTATAGTTCAATGGTGGTTTTACCTACTG

*Candida albicans*_strain_6408/8
 K39.1_ERG
 K44.1_ERG
 11.1d30
 11.1_d50
 23.2d30
 23.2D50

AACCAGCAGAAATCATTTGGGAAAAAAGAGAAACTTGTATGTTTTAA---
 AACCAGCAGAAATCATTTGGGAAAAAAGAGAAACTTGTATGTTTTAATAA
 AACCAGCAGAAATCATTTGGGAAAAAAGAGAAACTTGTATGTTTTAATAA
 AACCAGCAGAAATCATTTGGGAAAAAAGAGAAACTTGTATGTTTTAATAA
 AACCAGCAGAAATCATTTGGGAAAAAAGAGAAACTTGTATGTTTTA-TAA
 AACCAGCAGAAATCATTTGGGAAAAAAGAGAAACTTGTATGTTTTAATAA
 AACCAGCAGAAATCATTTGGGAAAAAAGAGAAACTTGTATGTTTTAATAA

*Candida albicans*_strain_6408/8
 K39.1_ERG
 K44.1_ERG
 11.1d30
 11.1_d50
 23.2d30
 23.2D50

 CGGGNNAACCTTTCAAAA
 CGGCCNAACTTTCAAAA
 CCGGGCAACTTTCA----
 CCCGGCCACCTTCAA--
 AACGNCNACTTTCAA--
 AACGCCAACCTTTCAAA

