



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

การแสดงออกของยีน *MRR1* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฟลูโคนาโซล ของเชื้อ *Candida parapsilosis*

Expression of fluconazole resistance *MRR1* gene in *Candida parapsilosis*

อัญญาภัทร์ ชัยจิตตารีย์¹, ศรีสุดา ปันณมานุสรณ์²

^{1,2}สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

บทคัดย่อ

Candida parapsilosis เป็นเชื้อยีสต์ที่จัดเป็นจุลชีพประจำถิ่นของมนุษย์ แต่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ในบุคคลที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ โดยยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อนี้ในปัจจุบัน คือ ยาฟลูโคนาโซล เนื่องจากมีความเป็นพิษที่ต่ำ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันอุบัติการณ์การดื้อยาฟลูโคนาโซลในเชื้อ *C. parapsilosis* เริ่มพบได้มากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *MRR1* ซึ่งเป็น transcription factor gene ทำหน้าที่ควบคุม efflux pump ในกระบวนการขับยาออกจากเซลล์ ผ่าน Major facilitator superfamily (MFS) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการดื้อยาฟลูโคนาโซล ด้วยวิธี RT-qPCR ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *MRR1* ของเชื้อ *C. parapsilosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 15 ไอโซเลท ที่มีระดับการดื้อยาฟลูโคนาโซลต่าง ๆ คือ กลุ่มเชื้อไวต่อยา (susceptible, n=2) กลุ่ม susceptible-dose-dependent (SDD, n=9) และกลุ่มดื้อยา (resistant, n=4) พบว่าไอโซเลททั้งหมดที่ทำการศึกษามีการแสดงออกในระดับต่ำ คือ ไม่พบการแสดงออกมากเกินไปของยีน *MRR1* เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ *C. parapsilosis* ATCC 22019 ซึ่งไวต่อยาฟลูโคนาโซล เมื่อจัดกลุ่มย่อยเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างทางคลินิกกับกลุ่มตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม พบว่ากลุ่มตัวอย่างทางคลินิกมีการแสดงออกของยีน *MRR1* มากกว่ากลุ่มตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมเฉลี่ย 10 เท่า ในกลุ่มที่ไวต่อยา (susceptible) และ 16 เท่า ในกลุ่ม susceptible-dose-dependent อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของยีน *MRR1* เพียงอย่างเดียวยังไม่สามารถสรุปการดื้อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. parapsilosis* ได้ ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายังมีกลไกอื่น ๆ ที่อาจควบคุมการดื้อยาฟลูโคนาโซลในเชื้อ *C. parapsilosis*

คำสำคัญ: ยีน *MRR1*, การดื้อยาฟลูโคนาโซล, *Candida parapsilosis*

Abstract

Candida parapsilosis is recognized as a normal flora yeast in human. This species, however, can cause infection in immunocompromised patients. Fluconazole is a common



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

drug used for the treatment of *Candida* infections due to its low toxicity. However, the incidence of fluconazole-resistance of *C. parapsilosis* has been increasingly reported. Therefore, this research aimed to study the expression of *MRR1* gene, a transcription factor gene that regulates efflux pump in the drug excretion process through the major facilitator superfamily (MFS), which is a key mechanism of fluconazole resistance, by RT-qPCR method. A total of 15 isolates of *C. parapsilosis* obtained from infected patients and environment were studied. The isolates included fluconazole susceptible (n =2), susceptible-dose dependent (SDD, n=9) and resistant (n =4). Our results showed that all isolates tested in this study showed a low expression of *MRR1* compared to wild type *C. parapsilosis* ATCC 22019. Comparison of *MRR1* expression in clinical isolates and environment isolates revealed that, in fluconazole susceptible, the clinical isolates showed 10-fold higher expression than the expression in the environmental isolates. The expression of *MRR1* of clinical isolates was increased to 16 folds in the SDD isolates compared to expression in environmental isolates. In summary, our results suggested that fluconazole resistance in *C. parapsilosis* involved several mechanisms, one of which is partially related to *MRR1* expression.

Keywords: *MRR1*, Fluconazole resistance, *Candida parapsilosis*

บทนำ

ความก้าวหน้าในการแพทย์แผนปัจจุบัน เพื่อยืดอายุของผู้ป่วย เช่น การใช้ยาเคมีบำบัด, การปลูกถ่ายอวัยวะ, การใช้สายสวนทางการแพทย์, การใช้เครื่องช่วยหายใจ และ การใช้ยาต้านจุลชีพในวงกว้าง เป็นสาเหตุของอุบัติการณ์ที่เพิ่มขึ้นของโรคติดเชื้อรา [1,2] อีกทั้งการติดเชื้อราในกระแสเลือดอันเนื่องมาจากแคนดิดา (*Candida*) หรือที่เรียกว่า Candidemia ได้กลายเป็นสาเหตุสำคัญของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล แคนดิดา เป็นเชื้อประจำถิ่นในคนปกติ สามารถก่อโรคได้ ตั้งแต่การติดเชื้อบริเวณผิวหนัง เยื่อเมือกในบริเวณช่องปาก ช่องคลอดและหลอดอาหารไปจนถึงการติดเชื้อที่อวัยวะภายในและในกระแสเลือด เชื้อก่อโรคที่พบมากที่สุด คือ *Candida albicans* ตามมาด้วยกลุ่ม non-*albicans Candida* [3,4]

ปัจจุบันยาที่เลือกใช้เป็นตัวแรกในการรักษา คือ Amphotericin B และ Fluconazole แม้ว่า Amphotericin B จะสามารถกำจัดเชื้อได้ดี แต่มีข้อจำกัด เนื่องจากผลข้างเคียงของยาที่มีความเป็นพิษสูงทั้งต่อไตและตับ จึงใช้ Amphotericin B ในการรักษาเฉพาะกรณีที่ติดเชื้อที่มีความรุนแรงเท่านั้น ฉะนั้น



Fluconazole จึงเป็นที่นิยมและแพร่หลายมากกว่า เพราะมีความเป็นพิษต่ำ สามารถละลายน้ำและแพร่กระจายไปตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ดีกว่า อย่างไรก็ตามการรักษาด้วย Fluconazole ก็อาจล้มเหลวได้เนื่องจาก *Candida* บางชนิดคือต่อยา Fluconazole โดยธรรมชาติ (intrinsic resistance) [5,6,7,8]

C. parapsilosis เป็นหนึ่งในกลุ่ม non-*albicans Candida* ที่พบมากเป็นอันดับ 2 หรือ 3 ของการติดเชื้อ Candidemia ผลจากการวิเคราะห์และเฝ้าระวังการดื้อยาด้านเชื้อราจากทั่วโลก พบว่ามีไอโซเลทที่ไวต่อยาในกลุ่ม Azole น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ [9,10,11] ในภูมิภาคเอเชีย-แปซิฟิก (Asia-Pacific) พบว่า *C. parapsilosis* มีความไวต่อยา Fluconazole น้อยลง (S = 94.8%) เมื่อเปรียบเทียบกับ *C. albicans* (S = 99.7%) ในประเทศไทย การดื้อยา Fluconazole แม้จะพบในระดับต่ำที่ 6.06% (S=84.85%, SDD=9.09%, R=6.06%) แต่งานวิจัยล่าสุดจากโรงพยาบาลศิริราช ประเทศไทย ชี้ให้เห็นว่าการดื้อยา Fluconazole ของ *C. parapsilosis* มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น [12,13,14]

การดื้อยา Fluconazole เกิดจากหลายกลไกในระดับโมเลกุลรวมกัน ประกอบไปด้วย 1. ความสัมพันธ์ระหว่างยากับตำแหน่งเป้าหมายเปลี่ยนแปลงไป มีการคาดการณ์ว่าอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน *ERG11* (lanosterol 14- α -Demethylase) ซึ่งเป็นเป้าหมายของ Fluconazole 2. การลดลงของยาที่อยู่ภายในเซลล์โดยมีสาเหตุมาจาก efflux pumps โดยการกลายพันธุ์ในยีน *MRR1* (Multidrug Resistance Regulator1) ที่เป็น transcription factor gene ทำหน้าที่ควบคุมการเข้ารหัส efflux pump ทำให้เกิดกระบวนการขับยาออกจากเซลล์ ผ่าน major facilitator superfamily (MFS) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการดื้อยา และในยีน *MRR1* ที่เป็น Polymorphism มีการระบุว่าเป็นการกลายพันธุ์แบบ Gain-Of-Function (GOF) ที่เกิดในตำแหน่ง Hot Spot ของยีนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านทาน Fluconazole ซึ่งกลไกการต้านทานนี้จะเกี่ยวข้องกับ *MDR1* Overexpression (15,16,17) ทั้งนี้ยังพบอีกว่า การแสดงออกของ *MRR1* และ *MDR1* เกี่ยวข้องกับการเกิด cross resistance ของยาด้านเชื้อราในกลุ่ม Azole ใน *C. parapsilosis* [18] และ 3. การก่อตัวของ biofilms

แม้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกมากเกินไปของยีน *MRR1* เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Fluconazole เชิงประจักษ์ แต่ในประเทศไทยยังมีจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *MRR1* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Fluconazole เพื่อเป็นแนวทางในการรับมือและพัฒนา การรักษาด้วยยาด้านเชื้อราในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงในอนาคตได้ทัน่วงที

วัตถุประสงค์

ศึกษาการแสดงออกของยีน *MRR1* ของเชื้อ *C. parapsilosis* ที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

ขอบเขตของการวิจัย

วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *MRR1* ที่ดื้อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. parapsilosis* กลุ่มตัวอย่างทางคลินิกเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ด้วยวิธี RT-qPCR

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เชื้อ *C. parapsilosis* ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ *C. parapsilosis* ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างทางคลินิก 11 ไอโซเลท และกลุ่มตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม 4 ไอโซเลท ตามค่า Fluconazole MIC (Minimum Inhibition Concentration) ดังนี้ (1) Susceptible (S), MIC ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ (2) Susceptible dose dependent (SDD), MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ และ (3) Resistant (R), MIC ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มา หมายเลขเชื้อ และผลการทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อราฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. parapsilosis* โดยมี *C. parapsilosis* ATCC22019 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน

Isolate No.	source	Microorganism	MIC Fluconazole ($\mu\text{g/mL}$)	CBPs	ECVs
18/117	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	0.5	S	non-WT
287/54	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT
136/55	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT
403/55	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT
048/56	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT
015/57	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT
42/59	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT
127/54	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	8	R	non-WT
19/75	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	32	R	non-WT
347/58	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	32	R	non-WT
132/58	Clinical	<i>C. parapsilosis</i>	64	R	non-WT
CP-ENV 21	Pediatric ward	<i>C. parapsilosis</i>	2	S	non-WT
CP-ENV 3	Bus handle	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT
CP-ENV 23	Pediatric ward	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT
CP-ENV 28	Handrail	<i>C. parapsilosis</i>	4	SDD	non-WT



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

2. การเตรียมเชื้อ *C. parapsilosis* ที่ใช้ในการศึกษา

นำเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้งหมดที่เก็บอยู่ใน -70 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextose agar (SDA) ที่ 37 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง เพื่อ reactivate จากนั้นใช้ 1 loopfull มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Sabouraud dextose broth (SDB) ปริมาณ 3 mL เขย่าที่ 140 รอบ/นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เชื้อนี้นำไปใช้สำหรับการทดสอบต่อไป

3. การเตรียม RNA ของเชื้อ *C. parapsilosis*

RNA ของเชื้อเตรียมด้วย Pure Link™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) ตามคู่มือของผู้ผลิต โดยเชื้อที่เลี้ยงในหลอดอาหาร SDB ปริมาตร 3 mL เขย่าที่ 140 รอบ/นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถูก transfer ใส่ microcentrifuge tube ปริมาตร 1.5 mL จำนวน 2 หลอด จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใส เติม Lysis Buffer with 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 μ L เก็บที่ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์แตกโดย vortex mixer และใช้ needle ดูดเชื้อขึ้นลง 10 ครั้ง เติม 1 volume 70% ethanol ปริมาตร 500 μ L ผสมให้เข้ากัน ปิเปตต์เชื้อจาก microcentrifuge tube ใส่ spin cartridge ปริมาตร 500 μ L นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 15 วินาที ทิ้งส่วนน้ำในหลอดเก็บสารด้านล่าง แล้วสวมหลอดเก็บสารเดิมกลับเข้าไปใน spin cartridge (ทำซ้ำ 3 รอบ) เติม Wash Buffer I ปริมาตร 700 μ L ลงใน spin cartridge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 15 วินาที ทิ้งส่วนน้ำในหลอดเก็บสารด้านล่าง แล้วสวมหลอดเก็บสารใหม่เข้าไปใน spin cartridge เติม Wash Buffer II with ethanol ปริมาตร 500 μ L ลงใน spin cartridge นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 15 วินาที ทิ้งส่วนน้ำในหลอดเก็บสารด้านล่าง แล้วสวมหลอดเก็บสารเดิมเข้าไปใน spin cartridge และเติม Wash Buffer II with ethanol ซ้ำอีกครั้ง จากนั้นทิ้งส่วนน้ำในหลอดเก็บสารด้านล่าง แล้วสวมหลอดเก็บสารเดิมเข้าไปใน spin cartridge ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 1 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้น นำ spin cartridge สวมเข้ากับ recovery tube เติม RNase free water ปริมาตร 50 μ L วางทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 2 นาที และเติม RNase free water ซ้ำอีกครั้ง จะได้อาร์เอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้ทั้งหมดเชื้อละ 100 μ L วัดความเข้มข้นและคุณภาพของ RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer (NanoDrop™ Lite) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เก็บตัวอย่าง RNA ที่ -30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดสอบต่อไป

4. การสังเคราะห์ cDNA และปฏิกิริยาลูกโซ่ reverse – transcription PCR (RT-PCR)

สังเคราะห์ cDNA สายแรกจากการทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองที่มี RNA 168 ng ปริมาตร 20 μ L ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Meridian Bioscience) ตามคู่มือการ



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

สกัดจากบริษัท ด้วยวิธีดังนี้ เตรียมสารละลายผสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ได้แก่ 5x TransAmp Buffer 4 μ L Reverse Transcriptase 1 μ L และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DNase/RNase free water) ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 20 μ L เนื่องจากกำหนดให้ความเข้มข้นของ RNA ในแต่ละไอโซเลทเท่ากัน จึงทำให้แต่ละไอโซเลทใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อและ RNA ที่ปริมาตรไม่เท่ากัน จากนั้นปิเปตต์สารละลายผสมใส่ใน PCR tube จากนั้นสังเคราะห์ cDNA ด้วยเครื่อง Thermal cycler กำหนดสภาวะที่เหมาะสม ดังนี้ Primer annealing อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที Reverse transcription อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 15 นาที และ Inactivation อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 5 นาที cDNA ที่ได้จะใช้สำหรับการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

5. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

ใช้ cDNA เป็นต้นแบบทำปฏิกิริยาด้วย SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Meridian Bioscience) และไพรเมอร์ที่จำเพาะ สำหรับยีน *ACT1* (RT_ACT1_F 5'-CGAGCATGGAAGGAATT GAT-3' และ RT_ACT1_R 5'-TGAGCTCAATCCAGCAACACC-3') ใช้เป็นยีนควบคุม และยีน *MRR1* (RT_MRR1_F 5'-GGGAAACAGTGCCGTGATTT-3' และ RT_MRR1_R 5'-ACACAGCGGCAATTGAA ACT-3') ซึ่งเป็นยีนที่ต้องการศึกษาการแสดงออก

สารประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 2x SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Mix 10 μ L 10 μ M Forward primer 0.8 μ L 10 μ M Reverse Primer 0.8 μ L cDNA template 2 μ L และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 6.4 μ L ได้ปริมาตรสุดท้ายรวม 20 μ L โดยปฏิกิริยาจะดำเนินในเครื่อง Real-time PCR กำหนดสภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ Pre-denaturation 95 องศาเซลเซียส 10 นาที Denaturation 95 องศาเซลเซียส 5 วินาที Annealing 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ Final extension 60 องศาเซลเซียส 1 นาที

หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย StepOne Software v2.3 การแสดงออกของยีน *MRR1* รายงานเป็นจำนวนเท่าของความสัมพันธ์ (relative normalized expression; Δ CT) ระหว่างยีน *MRR1* และยีนควบคุม *ACT1* ทำการตรวจสอบ PCR products ที่ได้ด้วยการรันบน 1.7% Agarose ถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยโปรแกรม SmartView Pro1100 Imager System ผ่านเครื่อง UVCI-1100

ผลการวิจัย

การศึกษาการแสดงออกของยีนเป็นการศึกษาในเชิงคุณภาพ (qualitative) โดยศึกษาว่า ยีน *MRR1* มีการแสดงออกของหน้าที่หรือไม่ โดยใช้ปฏิกิริยา RT-PCR และในปฏิกิริยาดังกล่าวใช้ template cDNA ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *MRR1* ในเชื้อ *C. parapsilosis* โดยใช้ *C. parapsilosis* ATCC 22019 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง และกำหนดให้การแสดงออกที่เพิ่มขึ้น 2 เท่า เป็นการ



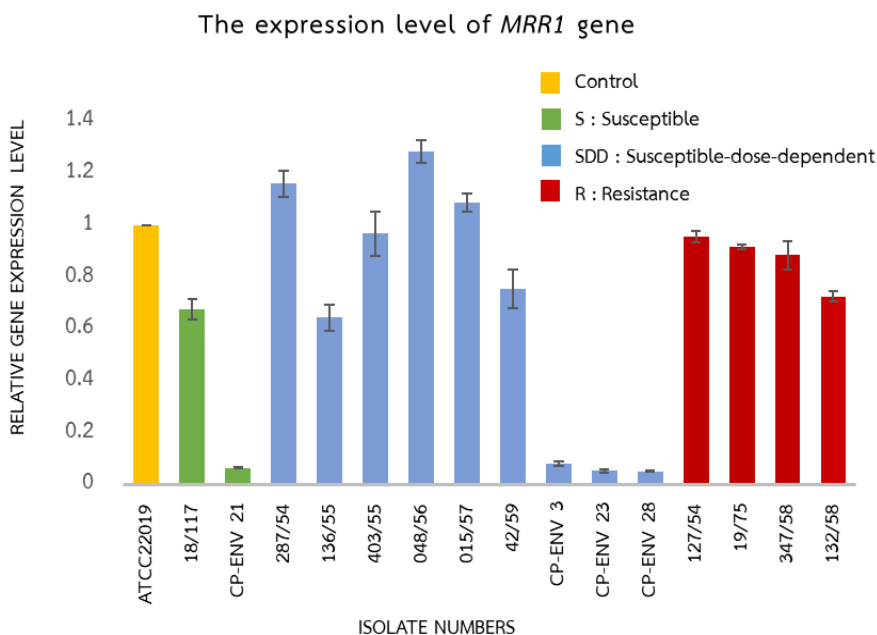
การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

แสดงออกมากเกินไป (overexpression) โดยจัดกลุ่มของเชื้อตามคุณสมบัติการดื้อยาฟลูโคนาโซล ได้แก่ เชื้อในกลุ่มที่ไวต่อยา (susceptible) 2 ไอโซเลท พบการแสดงออกของยีน *MRR1* ในระดับต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างทางคลินิก (ไอโซเลทหมายเลข 18/117) กับตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม (ไอโซเลทหมายเลข CP-ENV 21) พบการแสดงออกของตัวอย่างทางคลินิกมากกว่าตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม 10 เท่า ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้แสดงค่า MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$

เชื้อในกลุ่ม susceptible-dose-dependent 10 ไอโซเลท พบการแสดงออกของยีน *MRR1* ในระดับต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างทางคลินิก (ไอโซเลทหมายเลข 287/54, 136/55, 403/55, 048/56, 015/57 และ 42/59) กับตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม (ไอโซเลทหมายเลข CP-ENV 3, CP-ENV 23 และ CP-ENV 28) พบการแสดงออกเฉลี่ยของตัวอย่างทางคลินิกมากกว่าตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม 16 เท่า เชื้อกลุ่มนี้แสดงค่า MIC = 4 $\mu\text{g/mL}$

และเชื้อในกลุ่มดื้อยาฟลูโคนาโซล (resistance) 4 ไอโซเลท ทั้งหมดเป็นเชื้อจากกลุ่มตัวอย่างทางคลินิก ได้แก่ ไอโซเลทหมายเลข 127/54, 19/75, 347/58 และ 132/58 พบการแสดงออกของยีน *MRR1* อยู่ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม เชื้อกลุ่มนี้แสดงค่า MIC ตั้งแต่ 8 – 64 $\mu\text{g/mL}$ โดยไอโซเลททั้งหมดที่ทำการศึกษามิพบการ overexpression ของยีน *MRR1* แสดงดังภาพที่ 1



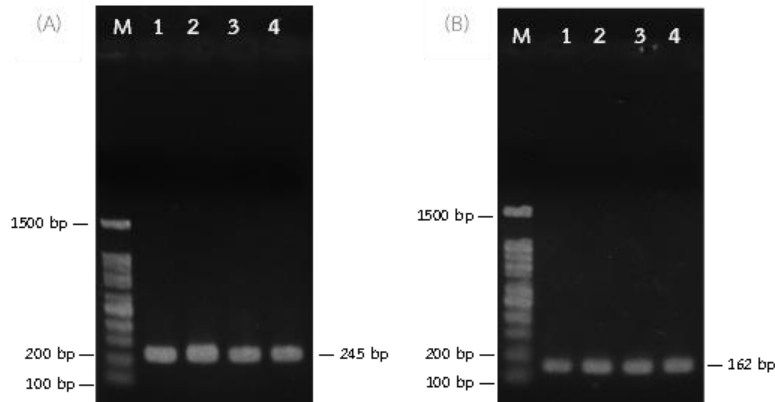
ภาพที่ 1 การแสดงออกของยีน *MRR1* ในเชื้อ *C. parapsilosis* ที่ดื้อยาฟลูโคนาโซลทั้งหมด 15 ไอโซเลท และมี *C. parapsilosis* ATCC22019 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง 1 ไอโซเลท และแถบ error bars แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

ตรวจสอบความถูกต้องของขนาด PCR Products โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่ายีน *MRR1* มีขนาด 245 คู่เบส และยีน *ACT1* มีขนาด 162 คู่เบส แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงขนาด PCR Product ของยีน โดยกำหนดให้ (A) ยีน *MRR1* และ (B) ยีน *ACT1* จากการทำ RT-qPCR ; lane M = marker (100 bp DNA Ladder RTU) lane 1 – 4 = PCR product ของ CP-ENV3, CP-ENV21, CP-ENV23 และ CP-ENV28 ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาระดับออกของยีนในเชิงคุณภาพ โดยการศึกษา ยีน *MRR1* ของเชื้อ *C. parapsilosis* ทั้งหมด 15 ไอโซเลท โดยมี *C. parapsilosis* ATCC22019 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง 1 ไอโซเลท จากการจัดกลุ่มของเชื้อตามคุณสมบัติการดื้อยาฟลูโคนาโซลหรือค่าความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida* หรือค่า MIC ($\mu\text{g/mL}$) ได้แก่ เชื้อในกลุ่มที่ไวต่อยา (susceptible) แสดงค่า MIC $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ เชื้อในกลุ่ม susceptible-dose-dependent แสดงค่า MIC = $4 \mu\text{g/mL}$ และเชื้อในกลุ่มดื้อยาฟลูโคนาโซล (resistance) แสดงค่า MIC ตั้งแต่ 8 – $64 \mu\text{g/mL}$ โดยกำหนดให้การแสดงออกที่เพิ่มขึ้น 2 เท่า เป็นการแสดงออกมากเกินไป (overexpression) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม พบว่าไอโซเลททั้งหมดที่ทำการศึกษา มีการแสดงออกในระดับต่ำ ไม่พบการแสดงออกมากเกินไปของยีน *MRR1* ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Branco et al., 2015) ที่พบการแสดงออกของยีน *MRR1* ที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล (R/MIC = $64 \mu\text{g/mL}$) มากกว่า *MRR1* (WT/ MIC = $1 \mu\text{g/mL}$) 3-4 เท่า และอาจเป็นไปได้ว่าในไอโซเลทที่ทำการศึกษาไม่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง hot spot region (G583R และ K873N) ที่ทำให้เกิดการแสดงออกมากเกินไปในยีน *MRR1* และเป็นคุณสมบัติของ GOF ที่ส่งผลต่อการ upregulation *MDR1* ทั้งนี้ในงานวิจัยของ Berkow et al., 2017 มีการระบุว่า การกลายพันธุ์ที่อยู่ในตำแหน่ง G583R ทำให้ *MDR1* overexpressing ใน *C. parapsilosis* สอดคล้องกับการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง L779F ใน *C. albicans* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิด upregulation ใน *MDR1*



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

และในงานวิจัยของ Zhang et al.,2015 พบว่าในไอโซเลท PU123 และ PU127 พบการแสดงออกของยีน *MRR1* ที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล (R/MIC= 32 µg/mL) มากกว่า *MRR1* (WT/ MIC = 1 µg/mL) อยู่ที่ 3.90 และ 3.99 เท่า ตามลำดับ โดยในไอโซเลทเหล่านี้ยังพบว่าการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง L986P และส่งผลต่อการ upregulation *MDR1* แม้ว่าหลายงานวิจัยจะบ่งชี้ว่าการแสดงออกของยีน *MRR1* และ *MDR1* เกี่ยวข้องกัน แต่ไม่ใช่ทั้งหมดของการเกิด overexpression จะเกี่ยวข้องกับ single nucleotide polymorphism (SNP) ใน *MRR1* (Grossman et al.,2015) (Pristov et al., 2019)

นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่ามีอุบัติการณ์ของยีน *MRR1* มากกว่าเชื้อในกลุ่มตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อม เชื้อในกลุ่มตัวอย่างทางคลินิกมีการแสดงออกของยีน *MRR1* มากกว่าเชื้อในกลุ่มตัวอย่างทางสิ่งแวดล้อมเฉลี่ย 10 เท่า ของเชื้อในกลุ่มที่ไวต่อยา (susceptible) และ 16 เท่า ของเชื้อในกลุ่ม susceptible-dose-dependent อาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มตัวอย่างทางคลินิก ซึ่งมีที่มาจากการแยกเชื้อจากสารคัดหลั่งของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาโรคติดเชื้อรา ที่ได้รับยาฟลูโคนาโซลในการรักษาโดยตรง อาจทำให้เชื้อมีวิวัฒนาการต่อยาฟลูโคนาโซลมากกว่าเชื้อในกลุ่มสิ่งแวดล้อม ที่แยกได้จากพื้นผิวของราวบันได ราวจับบนรถ NGV และวอร์ดรักษาผู้ป่วยเด็ก ซึ่งเชื้อที่แยกได้ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการได้รับการกระตุ้นจากยาฟลูโคนาโซลโดยตรง ทำให้การแสดงออกของเชื้ออยู่ในระดับต่ำ (Thomaz et al., 2018)

ข้อเสนอแนะ

อย่างไรก็ตามการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RT-qPCR และการเกิด overexpression ของยีน *MRR1* เพียงอย่างเดียวไม่สามารถสรุปการดื้อยาฟลูโคนาโซลของเชื้อ *C. parapsilosis* ได้ ต้องมีการศึกษาใน putative resistance genes และเทคนิคอื่นๆร่วมด้วย เช่น เทคนิค Next generation sequencing เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- Karabunus, A., et al. (1988). Risk Factors for Candidemia in Cancer Patients : a Case-Control Study. *Journal of clinical microbiology*, 26(3), 429-432.
- Solomkin, J. S., et al. (1980). The role of Candida in intraperitoneal infections. *Central surgical association*, 88(4), 524-530.
- Cordeiro, R.d.A., et al. (2017). Candida parapsilosis complex in veterinary practice: A historical overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits. *Veterinary microbiology*, 22(30),212.



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

- Trofa, D., Gácser, A., & Nosanchuk, J. D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 21(4), 606–625.
- Pumirat P., et al. (2013). Medical Mycology. *Journal of Medicine and Health Sciences*, 20(2).
- Sanglard, D. (2002). Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol*, 5(4), 379-85.
- Theodore, C.W., et al. (1998). Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology reviews*, 11(2), 382-402.
- Saag, M.S., & Dismukes, W.E. (1988). Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrobe Agents Chemother*, 32, 1-8.
- Marchetti, O., et al. (2004). Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clinical Infectious Diseases*, 38(3), 311-320.
- Voss, A., et al. (1996). Occurrence of Yeast Bloodstream Infections between 1987 and 1995 in Five Dutch University Hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(2), 909-912.
- Al-Tawfiq, J.A. (2007). Distribution and epidemiology of *Candida* species causing fungemia at a Saudi Arabian hospital, 1996-2004. *International Journal of Infectious Diseases*, 11, 239-244.
- Pharkjaksu, S., et al. (2018). Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among *Candida parapsilosis* complex isolates from clinical specimens at Siriraj Hospital, Thailand, from 2011 to 2015. *Medical Mycology*, 56:426–433
- Sriphanam, C., et al. (2019). Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *Journal de Mycologie Medicale*, 29, 325–330
- Pumirat, P., et al. (2013). Medical Mycology. *Journal of Medicine and Health Sciences*, 20(2)
- Elizabeth, L.B., & Shawn, R.L. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective, 44
- Xiang, M.J., et al. (2013). Erg11 mutations associated with azole resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*, 13(4), 386–393.
- Silva, D.B, et al. (2016). Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azole resistant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111(3), 192–199.



การประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 4

“GRADUATE SCHOOL CONFERENCE 2022 iHappiness: ความสุขและคุณภาพชีวิตที่ดีอย่างยั่งยืนในยุคสังคมดิจิทัล”

Berkow, E.L., et al.. (2015). Multidrug Transporters and Alterations in Sterol Biosynthesis Contribute to Azole Antifungal Resistance in *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 5942-5950