รูปแบบ RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

ใน ส่วน ribosomal DNA (rDNA) ของ *Candida* spp.

จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

นางสาวกมลรัตน์ โพธิ์ปิ่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3836-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE RIBOSOMAL DNA RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) PATTERNS OF ISOLATED *CANDIDA* SPP. FROM KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL

Miss Kamonrat Phopin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-3836-6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวกมลรัตน์ โพธิ์ปิ่น : รูปแบบของ restriction fragment length polymorphism (RFLP) ในส่วน ribosomal DNAของ *Candida* spp.จาก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (The ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of isolated *Candida* spp. from King Chulalongkorn Memorial Hospital)
อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินดามพร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, 124 หน้า, ISBN 974-17-3836-6

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษารูปแบบของ PCR-RFLP ในส่วน rDNA ของ *Candida* spp. ที่เพิ่มจำนวนขึ้นโดยใช้ ITS1 และ ITS4 primer และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัด PCR products ในการจัดจำแนกเชื้อ *Candida* spp. การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมในส่วนของ ITS-rDNA จากตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่างที่ได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลีนิค จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Candida* ที่ให้ขนาดของ PCR products ที่จำเพาะแตกต่างจากเชื้อตัวอื่นได้แก่ *C. glabrata* (875 bp) และ *C. guilliermondii* (608 bp) ส่วนเชื้อ *Candida* อื่น ๆ ให้ขนาดของ PCR products ประมาณ 500 bp [(C. *albicans* (536 bp), *C. tropicalis* (523 bp), *C. parapsilosis* (521 bp), *C. dubliniensis* (541 bp) และ *C. krusei* (510 bp)] จึงจำเป็นต้องศึกษารูปแบบของ RFLP จาก PCR products โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III, *Dde* I และ *Tru9* I ผลการศึกษาพบว่าจากรูปแบบ PCR-RFLP ของตัวอย่างทั้งหมด 120 ตัวอย่าง เทียบกับเชื้อมาตรฐานสามารถจำแนกได้เป็น *C. albicans* จำนวน 55 ตัวอย่าง (ร้อยละ 45.8), *C. tropicalis* จำนวน 26 ตัวอย่าง (ร้อยละ 21.7), *C. parapsilosis* จำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 15.8), *C. glabrata* จำนวน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.5), *C. dubliniensis* จำนวน 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.0), *C. guilliermondii* จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.5) และ *C. krusei* จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.6) เมื่อทำการจำแนกชนิดด้วย วิธีดั้งเดิม (Conventional Methods) และวิธีทางอณูชีววิทยา (PCR-RFLP) สามารถจำแนกเชื้อได้ผลตรงกัน จำนวน 114 ตัวอย่าง จาก 120 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 95 ส่วนตัวอย่างที่ผลการจำแนกชนิดไม่ตรงกันอีก 6 ตัวอย่าง นั้นโดยวิธีดั้งเดิมให้ผลเป็น *C. albicans* ขณะที่วิธี PCR-RFLP เป็น *C. dubliniensis* จากการศึกษารูปแบบของ PCR-RFLP ด้วย *Hae* III และ *Dde* I ให้ผลสอดคล้องกับรูปแบบที่ได้จากเชื้ออ้างอิง สำหรับผลจากเอนไซม์ *Tru9* I ของเชื้อจำนวน 40 ตัวอย่าง ที่จัดจำแนกด้วยวิธีดั้งเดิม และวิธี PCR-RFLP ของเอนไซม์ 2 ชนิดข้างต้นได้เป็น *C. albicans* นั้น ได้รูปแบบที่ต่างจากรูปแบบของรูปแบบของ *C. albicans* ที่เป็นเชื้ออ้างอิง จึงได้ตรวจสอบด้วยเอนไซม์ *Mbo* I พบว่า ทั้งหมดมีรูปแบบเช่นเดียวกับรูปแบบของ *C. albicans* ที่เป็นเชื้ออ้างอิง การเกิดรูปแบบใหม่ของ PCR-RFLP อาจเนื่องจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ ในลำดับเบส ที่ตรงกับ recognition site ของ *Tru9* I ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การจำแนกเชื้อ *Candida* ด้วยวิธี PCR-RFLP ในส่วน rDNA นั้น ให้ความรวดเร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำสูงในการจำแนกเชื้อ *Candida* spp. ที่มีความสำคัญทางการแพทย์

สาขาวิชา จุลชีวิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา) ลายมือชื่อนิสิต กมลรัตน์ โพธิ์ปิ่น

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4389052820 : MAJOR : MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD: CANDIDA SPECIES/ RFLP/ rDNA / ITS / IDENTIFICATION
KAMONRAT PHOPIN: THE RIBOSOMAL DNA RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP) PATTERNS OF ISOLATED *CANDIDA* SPP. FROM KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL
THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR ARIYA CHINDAMPORN, Ph.D.
THESIS CO-ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR PARVAPAN BHATTARAKOSOL, Ph.D.
124 pp ISBN 974-17-3836-6

This study is to differentiate *Candida* spp. by using PCR-RFLP profiles of ITS-rDNA region. The ITS1 and ITS2 primers were used to amplify the region between ITS 1 and 2 and then the obtained PCR product was digested by restriction enzymes. One hundred twenty clinical isolates of *Candida* were recruited. The result showed that the size of PCR product from *C. glabrata* (875 bp) and *C. guilliermondii* (608 bp) was distinct. In contrast, the PCR yield from other species revealed almost the same size of 500 bp approximately (*C. albicans* 536 bp, *C. tropicalis* 523 bp, *C. parapsilosis* 521 bp, *C. dubliniensis* 541 bp, *C. krusei* 510 bp). Hence, further experiment of PCR-RFLP using single restriction enzyme *Hae* III, *Dde* I and *Tru*9 I was performed. Based on the reference strains, it was possible to differentiate 120 isolates by PCR-RFLP as follows: 55 *C. albicans* (45.8%), 26 *C. tropicalis* (21.7%), 19 *C. parapsilosis* (15.8 %), 9 *C. glabrata* (7.5 %), 6 *C. dubliniensis* (5.0%), 3 *C. guilliermondii* (2.5 %) and 2 *C. krusei* (1.6%). The conventional and PCR-RFLP identification was concordant for 114 of 120 *Candida* isolates with 95% identity. The left six isolates were identified as *C. albicans* by phenotypic method and did not agree with their phenotypic identifications and *C. dubliniensis* by PCR-RFLP profiles. The PCR-RFLP profiles using single digestion by *Hae* III, *Dde* I, and *Tru*9 I revealed the similar patterns to those from reference strains except the profiles from 40 samples of the enzyme *Tru*9 I digestion. These forty isolates were identified as *C. albicans* by other method and other enzymes digestion. Then, the RFLP of the PCR product with *Mbo I* was performed. The results showed that all the RFLP profiles were identical to *C. albicans* reference strain profile. This polymorphism might due to the mutation of the base position at *Tru9* I recognition site. In conclusion, the method of PCR-RFLP in the region between ITS 1 and 2 is the rapid method with high accuracy and useful in differentiate *Candida* important yeasts.

Field of study Medical Microbiology
Academic 2003

Student's signature Kamonrat Phopin
Advisor's signature Ariya Chindamporn
Co- advisor's signature Parvapan Bhattarakosol

ACKNOWLEDGEMENTS

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

Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D., Mycobiology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her kindness valuable advices, encouraging guidance, initiating and indispensable help in supervising this thesis.

Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D., Virology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for her kindness, encouraging, guidance, and valuable advice.

Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. Med. Vet., the chairman of thesis committee, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Chulalongkorn University, and Professor Nongnuch Vanittanakom, Ph.D., Department Microbiology, Faculty of Medicine, Chaingmai University, the member of thesis committee for her kindness, valuable comments helpful suggestion for the complements of this thesis. I also indebted to my external examining committee, for her valuable and comment for the complete of the thesis.

We are grateful to Laboratory of Medical Mycology, Nagoya University School of Medicine, Japan, for providing the *Candida* reference strains.

I will forever be indeleted Ms. Poomjit Yamyun, Mrs. Wannachun Thungsinthornkhan, Mr. Thongbai Pootong, Miss Mutita Sittimateekul, Miss Thida Thaweephon and Miss Sirada Kaocharoen for their encouragements and kindness in every way, it would have been impossible for me to carry on this thesis successfully.

Sincere thank go to the staffs at the Mycology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine Chulalongkorn University, for providing the sample specimens.

Finally, I am deeply indebted to my parents for their understanding and support during my study period and thanks so much to everybody who is involved in my thesis for their eternal love, encouragements, kindness and adoration will always be remembered.

LIST OF TABLES

Table		Page
1	: Distribution of *Candida* species recovered from blood culture in Europe, Canada, Latin America, and the United State, report by SENTRY anti-microbial surveillance program.....	5
2	: Species distribution of Candida bloodstream isolate in the EIEIO program, 1998 to 2001.....	5
3	: A partial list of pathogenic species of *Candida*	12
4	: Morphological features of selected pathogenic species of *Candida*.....	12
5	: Cultural and biochemical characteristic of yeasts frequently isolated from clinical specimens	16
6	: *Candida* species identification by molecular technique.....	37
7	: The positions for nucleotide changes and deletions	39
8	: Physiological criteria for identification of *Candida* species	47
9	: The cleavage site of *Hae* III, *Dde* I, *Tru9* I and *Mbo* I restriction enzymes.....	53
10	: PCR products size of *Candida* species using ITS1 and ITS4 primers.....	55
11	: RFLP patterns of *Candida* species using *Hae* III enzyme.....	56
12	: RFLP patterns of *Candida* species using *Dde* I enzyme.....	57
13	: RFLP patterns of *Candida* species using *Tru9* I enzyme.....	58
14	: The results of 120 *Candida* species identified be convention and API 20C AUX.....	64
15	: All 120 *Candida* isolates were identified by conventional assay...	73

CONTENTS

			Page
ABSTRACT (THAI).....			iv
ABSTRACT (ENGLISH).....			v
ACKNOWLEDGEMENTS.....			vi
CONTENTS.....			vii
LIST OF TABLES.....			viii
LIST OF FIGURES.....			xi
ABBREVIATION.....			xiii
CHAPTER	I	INTRODUCTION	1
	II	OBJECTIVES.....	7
	III	REVIEW LITERATURE.....	8
	IV	MATERIALS AND METHODS.....	43
	V	RESULTS.....	61
	VI	DISSCUSSIONS.....	96
REFERENCES			101
APPENDICES.....			117
BIOGRAPHY.....			124

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES (Continued)

Table		Page
16	: 38 unidentified *Candida* isolates were identified by *Candida* commercial kit (API 20C AUX).....	73
17	: Distribution of *Candida* species which results from routine and conventional method in clinical specimens.....	74
18	: Distribution of *Candida* species, which results from *Candida* commercial kit (API 20C AUX) in clinical specimens.....	75
19	: PCR products of *Candida* rDNA with ITS1 and ITS4 primers in seven difference *Candida* species reference strains.....	79
20	: Restriction digestion of PCR products with the enzyme *Hae* III in seven difference *Candida* species reference strains.....	80
21	: RFLP patterns of seven difference *Candida* species using *Dde* I enzyme analyzed by Bioedit program.....	81
22	: RFLP patterns of seven difference *Candida* species using *Tru9* I enzyme analyzed by Bioedit program.....	82
23	: PCR patterns of *Candida* species in clinical specimens using ITS1 and ITS4 primers.....	85
24	: RFLP patterns of *Candida* species in clinical specimens using *Hae* III enzyme.....	86
25	: RFLP patterns of *Candida* species in clinical specimens using *Dde* I enzyme.....	87
26	: RFLP patterns of *Candida* species in clinical specimens using *Tru9* I enzyme.....	88
27	: Summarize of RFLP atypical patterns of *C. albicans* in clinical specimens.....	91

LIST OF TABLES (Continued)

Table		Page
28	: Summarize *Candida* spp. and number of isolates from each enzyme.....	92
29	: Summarize of *Candida* isolate in clinical specimen by PCR-RFLP	93
30	: Comparison results between conventional method plus *Candida* commercial kits (API 20C AUX) and PCR-RFLP assay.....	94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	: Causative agents for visceral mycoses in autopsy cases.....	3
2	: The growth forms of *Candida* species.	11
3	: Representation of the rDNA gene complex in fungi denoting gene order and position of the ITS region.....	31
4	: The API 20C AUX (bioM'erieux, France) sheet results.....	48
5	: Diagram of PCR products size of *Candida* species using ITS1 and ITS4 primers.....	55
6	: Diagram of PCR-RFLP patterns of *Candida* species using *Hae* III enzyme.....	56
7	: Diagram of PCR-RFLP patterns of *Candida* species using *Dde* I enzyme.....	57
8	: Diagram of PCR-RFLP patterns of *Candida* species using *Tru9* I enzyme.....	58
9	: Sources and number of clinical specimens, which *Candida* was isolated during January to October 2002 from Mycology Unit, King Chulalongkorn Memorial Hospital.....	62
10	: *Candida* species identification by using conventional assay and *Candida* commercial kit (API 20C AUX).....	71
11	: Sources and number of clinical specimens, which *Candida* was identified by conventional and *Candida* commercial kit.....	72
12	: Sensitivity of DNA detection by PCR of seven difference *Candida* DNA with ethidium bromide staining on agarose gel electrophoresis.....	76
13	: PCR amplification of *Candida* rDNA with ITS1 and ITS4 primers in seven difference *Candida* species reference strains.....	79
14	: Restriction digestion of PCR products with the enzyme *Hae* III in seven difference *Candida* species reference strains.....	80

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure		Page
15	: Restriction digestion of PCR products with the enzyme *Dde* I in seven difference *Candida* species reference strains.....	81
16	: Restriction digestion of PCR products with the enzyme *Tru9* I in seven difference *Candida* species reference strains.....	82
17	: PCR amplification of *Candida* rDNA with ITS1 and ITS4 primers in clinical isolates.....	85
18	: Restriction digestion of PCR products with the enzyme *Hae* III in clinical isolates	86
19	: Restriction digestion of PCR products with the enzyme *Dde* I in clinical isolates	87
20	: Restriction digestion of PCR products with the enzyme *Tru9* I in clinical isolates	88
21	: RFLP patterns of *C. albicans* atypical *Tru9* I RFLP patterns.....	89
22	: PCR products and RFLP patterns in *Hae* III and *Dde* I of *C. albicans* atypical *Tru9* I RFLP patterns.....	90
23	: RFLP pattern in *Mbo* I of *C. albicans* atypical *Tru9* I RFLP patterns.....	91
24	: Summarize of PCR-RFLP patterns of 120 *Candida* isolates in clinical specimens.....	93
25	: The chromatogram obtained from automate sequencing showed insertion mutation within ITS region of *C. albicans* rDNA, A) showed the reference strain and B) showed the clinical strain...	95

ABBREVIATIONS

bp	base pair
°C	degree celsius
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytosine 5'-triphosphate
DW	distilled water
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
et al.	et alii
g	gram
hr	hour
M	molar
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute(s)
mM	millimolar
NaCl	sodium chloride
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomol
RNA	ribonucleic acid
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid
18S rDNA	eighteen subunit ribosomal deoxyribonucleic acid
5.8S rDNA	five point eight subunit ribosomal deoxyribonucleic acid
28S rDNA	twenty-eight subunit ribosomal deoxyribonucleic acid
ITS 1 region	internal trancribed spacer one region
ITS 2 region	internal trancribed spacer two region
ITS 1 primer	internal trancribed spacer one primer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS (Continued)

ITS 4 primer	internal trancribed spacer four primer
sec	second
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris-acetate-EDTA
U	unit
µg	microgram e
µl	microliter
UV	ultraviolet
V	volt

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย