ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลและความไวรับต่อยาต้านเชื้อราของ *Candida* ที่แยกจากช่องปากของผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

นางสาวธิดา ทวีผล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3835-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY OF CANDIDA STRAINS ISOLATED FROM ORAL CAVITY OF HIV-POSITIVE PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL

Miss Thida Thaweephon

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

ISBN 974-17-3835-8

Thesis Title	MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY OF CANDIDA STRAINS ISOLATED FROM ORAL CAVITY OF HIV-POSITIVE PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL
By	Miss Thida Thaweephon
Field of study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D.

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

.....Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

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

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D.)

.....Member

(Professor Nongnuch Vanittanakom, Ph.D.)

ธิดา ทวีผล : ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลและความไวรับต่อยาต้านเชื้อราของ *Candida* ที่แยกจากช่องปากของผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* strains isolated from oral cavity of HIV-positive patients at King Chulalongkorn Memorial Hospital) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อริยา จินดามพร, 118 หน้า, ISBN 974-17-3835-8

งานวิจัยได้ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของยาต้านเชื้อราต่อ *Candida* spp ที่แยกได้จากช่องปากของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอชไอวีและเป็นโรค oral candidiasis จำนวน 98 ราย การเลือกโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA จะสุ่มเลือกยีสต์จำนวน 2 โคโลนีหากโคโลนีมีลักษณะเหมือนกัน และเลือกทุกโคโลนีสำหรับลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จากนั้นทำการจัดจำแนกสปีชีส์โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี ศึกษารูปแบบของโครโมโซมด้วยวิธี pulse-field gel electrophoresis (PFGE) *C. albicans* 2 isolates ที่มาจากผู้ป่วยรายเดียวกันและมีรูปแบบของโครโมโซมแบบเดียวกัน จะนำมาวิเคราะห์ต่อด้วย RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sma* I และ Southern hybridization ด้วย RPS102 probe ซึ่งมีความจำเพาะต่อ *C. albicans* และศึกษาหาค่า MIC ของ amphotericin B, 5-flucytosine, fluconazole, itraconazole และ ketoconazole ต่อ *Candida* สปีชีส์ต่างๆ และ *C. albicans* ที่มีรูปแบบของโครโมโซมต่างกันที่พบอยู่ร่วมกันในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยวิธี Etest ผลการทดลองพบว่าแยกเชื้อได้ทั้งหมด 197 isolate จากผู้ป่วย 98 ราย โดยมี 91 ราย ที่แต่ละรายลักษณะโคโลนีเหมือนกันหมด และ 7 ราย ที่พบลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ในกลุ่มที่ลักษณะโคโลนีเหมือนกันหมดพบ *C. albicans* (180 isolate/90 ราย) และ *C. glabrata* (2 isolate/1 ราย) ขณะที่ในกลุ่มที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันพบการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *C. albicans* กับ *C. glabrata* (2 ราย) *C. albicans* กับ *C. tropicalis* (2 ราย) *C. albicans* กับ *C. krusei* (1 ราย) *C. albicans* กับ *C. rugosa* (1 ราย) และมี 1 ราย พบการติดเชื้อร่วมกัน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *C. albicans*, *C. glabrata* และ *C. tropicalis* ผลจากการศึกษารูปแบบของโครโมโซมแสดงให้เห็นว่า *C. albicans*, *C. glabrata* และ *C. tropicalis* มีจำนวนรูปแบบของโครโมโซม 101, 4 และ 3 รูปแบบตามลำดับ และ *C. krusei* กับ *C. rugosa* แต่ละชนิดมี 1 รูปแบบ ผู้ป่วย 58 ราย (ร้อยละ 59) และ 33 ราย (ร้อยละ 34) ซึ่งในแต่ละรายมีเชื้อ 2 isolates ที่มีรูปแบบของโครโมโซมต่างกันและเหมือนกันตามลำดับ โดยในรายที่มีรูปแบบของโครโมโซมเหมือนกันเชื้อทั้งหมดเป็น *C. albicans* ยกเว้น 1 รายที่เป็น *C. glabrata* นำ *C. albicans* เหล่านี้ไปยืนยันด้วยวิธี RFLP และ Southern hybridization พบว่าเชื้อในผู้ป่วย 30 ราย แต่ละรายมีรูปแบบของโครโมโซมและรูปแบบของการ hybridize ด้วย RPS เหมือนกัน ขณะที่ใน 2 ราย พบว่า *C. albicans* ทั้ง 2 isolates มีรูปแบบของการ hybridize ด้วย RPS แตกต่างกัน

เชื้อจากรายที่มีการติดเชื้อร่วมกันระหว่างต่างสปีชีส์และจากรายที่มีรูปแบบโครโมโซมของ *C. albicans* 2 แบบ จะนำมาหาค่า MIC เป็นที่น่าสนใจว่ากลุ่ม non-*albicans* ทั้งหมดมีความไวรับต่อยาต้านเชื้อรา 1 หรือมากกว่า 1 ชนิด น้อยกว่า *C. albicans* ส่วนมาก *C. albicans* จะมีความไวรับต่อยาต้านเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ยกเว้น 4 isolates ซึ่งมีความต้านทานต่อ fluconazole และ itraconazole การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบความไวรับต่อยาต้านเชื้อราระหว่าง *C. albicans* 2 isolate ในผู้ป่วยแต่ละราย โดยสรุป PFGE และ RFLP ตามด้วยการ hybridize เป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการแสดงความหลากหลายของเชื้อ *Candida* ในช่องปาก พบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อต่างสปีชีส์และต่างสายพันธุ์ในผู้ป่วยรายเดียวกัน พบแนวโน้มในการดื้อต่อยาต้านเชื้อราของกลุ่ม non-*albicans* และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบความไวรับต่อยาและรูปแบบของยีน

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....ธิดา ทวีผล.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....อริยา จินดามพร.....

ปีการศึกษา 2546

4389072320 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD : *CANDIDA* SPP. / PULSE-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) / ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY

THIDA THAWEEPHON : MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY OF CANDIDA STRAINS ISOLATED FROM ORAL CAVITY OF HIV-POSITIVE PATIENTS AT KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. ARIYA CHINDAMPORN, Ph.D., 118 pp. ISBN 974-17-3835-8

To perform the strain variation study and minimum inhibitory concentration (MIC) of antifungal drugs among *Candida* spp. isolated from the oral cavity of human immunodeficiency virus (HIV)-positive patients with oral candidiasis, the yeast isolates from oral swab of 98 patients were recruited. Two single colonies from homogeneous phenotype on Sabouraud dextrose agar and all heterogeneous colonies were selected. All cultures were identified by morphological and biochemical examinations. The electrophoretic karyotyping were assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Two isolates of *Candida albicans* with identical karyotype from individual were further characterized by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using *Sma*I restriction enzyme with Southern hybridization using RPS102 specific probe. The MIC of antifungal drugs: amphotericin B, fluconazole, itraconazole, ketoconazole and 5-flucytosine against the mixed population of species and strains in individual were determined by Etest. The result showed that totally 197 isolates from 98 HIV-infected patients was selected. Based on the phenotypic pattern, the cultures from 91 cases illustrated homogeneous morphology and 7 cases showed heterogeneous type. *C. albicans* (180 isolates from 90 cases) and *C. glabrata* (2 isolates from 1 case) were identified from individual in the homogeneous type. In contrast, the mixed population of *C. albicans* with 1-2 different species of *Candida* in oral cavity from individual were found in heterogeneous type (7 cases). Those species were *C. glabrata* (2/7 cases), *C. tropicalis* (2/7 cases), *C. krusei* (1/7 case), and *C. rugosa* (1/7 case). One out of the seven cases illustrated *C. albicans* in combination with *C. glabrata* and *C. tropicalis*. Due to electrophoretic karyotype study, 101 *C. albicans* karyotypes, 4 *C. glabrata* karyotypes, 3 *C. tropicalis* karyotypes and 1 karyotype of each *C. krusei* and *C. rugosa* were found. Fifty-eight patients (59%) and thirty-three patients (34%) were harbored two different and two identical karyotypes, respectively, in individual. All the identical karyotypes were identified as *C. albicans* except one which was *C. glabrata*. These *C. albicans* isolates (64 isolates/32 cases) were verified for the strain identity by PFGE and *Sma* I RFLP with RPS hybridization. The result showed that the isolates from 30 cases demonstrated the identical of both karyotypic and RPS hybridization profiles whereas two cases was difference.

All the mixed population isolates in both species level and chromosomal level were used to determine the MIC. It is of interesting that all the non-*albicans* demonstrated the less susceptible to at least one or more kinds of antifungal drugs. Most of *C. albicans* isolates were susceptible to all five antifungal agents, except four isolates were resistant to fluconazole and itraconazole. No difference in antifungal susceptibility profile between two isolates in each individual were exhibited. In conclusion, PFGE and RFLP with hybridization is the useful method to show genetic heterogeneity within oral isolates. The mixed population of both species level and chromosomal level were found. The trend of resistant strains of non-*albicans* species and no correlation between antifungal susceptibility profile and genotypic profile were revealed.

Department Medical Microbiology Student's signature Thida Thaweephon

Field of study Medical Microbiology Advisor's signature Ariya Chindamporn

Academic year 2003

ACKNOWLEDEMENTS

I wish to express my deep gratitude to Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D., of Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her valuable advices, indispensable help, encouraging guidance, initiating ideas and construction criticisms throughout my study.

My appreciation is also express to Associate Professor Somchai Jongwuthivej, MD., Ph.D., Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalogkorn University, for his kindness in guidance and supporting the instrument throughout this study.

My sincere gratitude is also given to the members of my advisor committee, Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. vet., of Department of Microbiology, Facultulty of Veterinary Science, Chulalongkorn University and Professor Nongnuch Vanittanakom, Ph.D., of Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiangmai University, for their kindness, valuable comments helpful sugesstion for the complement of this thesis. I also indebted to my external examining committee, for her valuable and comments for the complete of the thesis.

Most sincerely, the investigator is deeply indepted to Ms. Poomjit Yamyuan, Mrs. Wannachun Thungsunthornkhan, Mr. Thongbai Pootong, Miss Kamonrat Phopin, Miss Sirada Kaocharoen, Miss Mutita Sittimateekul and Miss Supinda Sirivarasin for their encouragement and kindness in every way, it would have been impossible for me to carry on this thesis successfully.

Finally, I wish to express all my deepest gratitude to all members of my family and thanks so much to Mr. Songsak Rugsasuk who is involved in my thesis for their eternal love, encouragement, kindness and adoration will always be rememberd.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	x
ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION	1
II. OBJECTIVES	4
III. LITERATURE REVIEWS	5
IV. MATERIALS AND METHODS	40
V. RESULTS	53
VI. DISCUSSION	83
REFERENCES	88
APPENDICES	102
APPENDIX I	103
APPENDIX II	106
BIOGRAPHY	118

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	A partial list of pathogenic species of *Candida*	6
2.	Morphological features of selected pathogenic species of *Candida*.....	8
3.	Antifungal drugs for treatment of oropharyngeal candidiasis	15
4.	Summary of the M27-A method developed by the NCCLS	32
5.	Cultural and biochemical characteristics of yeasts frequently isolated from clinical specimens	44
6.	Etest quality control specifications for antifungal susceptibility testing.....	51
7.	NCCLS M27-A MIC interpretive criteria	52
8.	Demographics and baseline characteristics of 98 HIV-infected subjects with oral candidiasis who visited Outpatient Clinic, King Chulalongkorn Memorial Hospital during March 1996 to April 1997	53
9.	Antifungal drugs that used to treat oral candidiasis in 21 HIV-infected patients	54
10.	The number of isolated *Candida* from 98 HIV-infected patients with oral candidiasis during March 1996 to April 1997 based on morphological and biochemical tests (Total isolates = 197)	55

Table **Page**

11. The numbers of patients and the numbers of *Candida* strains based on colony characteristics in each sample: homogeneous and heterogeneous colony type 56

12. The electrophoretic karyotypes of isolates of *Candida* from oral candidiasis in HIV-infected patients 59

13. The single and multiple karyotypic profiles in each patient in view of homogeneous and heterogeneous colony type 60

14. Distribution of single and multiple karyotypes of *C. albicans* infection in patients with ARC (AIDS related complex) and AIDS group ... 60

15. Frequencies of different electrophoretic karyotypes among isolates of *C. albicans* from HIV-infected patients 61

16. DNA typing results for *C. albicans* isolates from 32 HIV-infected patients with oral candidiasis 73

17. Susceptibility profile of *Candida* spp. isolates against five antifungal drugs 79

18. Illustrates the MIC values of the five antifungal drugs against isolates of *C. albicans* and non-*albicans* species which was isolated from individual patients 81

19. Variation in MICs of five antifungal drugs among isolates of *C. albicans* from patients with a two different karyotypes infection in individual 82

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	The growth form of *Candida* species	7
2.	The germ tubes formation in serum for 3 hours (A) and chlamydoconidia from cultures grown on cornmeal-Tween agar (B)	9
3.	A map of chromosome 7 showing the orientation and fine structure of the MRS	19
4.	Schematic representation of the structure of RPS units	20
5.	Physical map of the DNA probe Ca3, 27A and RPS cluster of *C. albicans*	29
6.	Chemical structures of antifungal agents in current use	35
7.	The API 20C AUX (bioM'erieux, France) sheet results	43
8.	Examples of homogeneous (A) and heterogeneous (B) colony type of *Candida* isolates in each HIV-infected patients with oral candidiasis	57
9.	Schematic representation of the 101 karyotypes of *C. albicans*	62
10.	Two different karyotypic profile of homogeneous phenotypic type of *C. albicans* strains from each HIV-infected patients	67
11.	Single karyotypic profile of *Candida* isolates in each HIV-infected patient	68

Figure **Page**

12. Mixed infection of *C. albicans* with non-*albicans* species from oral lesion in four HIV-infected patients 69

13. *Sma*I digestion profiles of *C. albicans* strains recovered from four patients 72

14. Hybridization patterns of *C. albicans* chromosome digested by *Sma*I and southern hybridize with repetitive sequence RPS102 probe 76

15. The distinguished hybridization profiles from the same karyotypic profile in individuals..... 77

16. Schematic representation of the 18 hybridization patterns of RPS102..... 78

ABBREVIATIONS

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ARC	AIDS related complex
bp	base pair (s)
CHEF-DRIII	Contour-clamped homogenous electric field apparatus
°C	degree celcius
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	Et alli
Fig.	figure
g	gram (s)
h	hour (s)
HIV	human immunodeficiency virus
kb	kilobase (s)
Mb	megabase
µg, µl	microgram (s), microliter (s)
mg, ml	milligram (s), milliliter (s)
M, mM	molar (s), millimolar (s)
min	minute (s)
NCCLS	National Committee for Clinical laboratory Standards
No	number
OPC	oropharyngeal candidiasis
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
RFLP	restriction fragment length polymorphism
Rnase	ribonuclease
rpm	revolutions per minute
sec	second (s)
U	unit
UV	ultraviolet
V	volt
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume