Thesis Title Roles of *ERG11 AFR1* and *MDR1* Genes of *Cryptococcus neoformans* in Fluconazole Resistance

Author Mrs. Suwannee Keerativasee

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Assoc.Prof.Dr. Pojana Sriburee Chairperson
Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul Member

ABSTRACT

A total of 190 *Cryptococcus neoformans* isolates, including 166 clinical and environmental isolates from Chiang Mai and 24 environmental isolates from Nan province, were tested for their susceptibilities to amphotericin B, fluconazole, itraconazole and ketoconazole. The MICs were determined by using the standard NCCLS broth microdilution methods (M27-A2). All 190 isolates of *C. neoformans* were susceptible to all four antifungal drugs. The MICs50 and MICs90 of amphotericin B, fluconazole, itraconazole and ketoconazole were 0.5 and 1 μg/ml, 2 and 4 μg/ml, 0.03 and 0.06 μg/ml and 0.06 and 0.125 μg/ml, respectively. No fluconazole resistant strains were found.

Recently, strains of *C. neoformans* expressing heteroresistance to fluconazole have been reported in other countries. To investigate the presence of fluconazole heteroresistance among these northern isolates, a total of 14 isolates for which the MICs of fluconazole ranged from 8 to 16 μg/ml were selected to screen. Fluconazole heteroresistance was characterized by the ability to grow at 30^{o}C but not at 37 ^{o}C on potato dextrose agar containing 64 μg of fluconazole/ml. Of the 14 *C. neoformans* isolates tested, one clinical isolate (CN4969) exhibited heterogeneity in fluconazole resistance. One subpopulation of this isolate (CN4969HR) which grew at 30^{o}C on potato dextrose agar containing 64 μg of fluconazole/ml exhibits fluconazole resistant

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

phenotype (MIC ≥ 64 μg/ml by broth microdilution method and ≥ 256 μg/ml by E-test). Another subpopulation (CN4969S) exhibited fluconazole susceptible phenotype (MIC = 8 μg/ml by broth microdilution method and E-test). This study demonstrated the existing of the fluconazole heteroresistant population among clinical isolates of *C. neoformans* in northern part of Thailand.

To clarify the molecular mechanisms of fluconazole resistance, drug resistance genes (*ERG11*; lanosterol 14α-demethylase gene, *AFR1*; Antifungal resistance 1 gene and *MDR1*; Multidrug resistance1 gene) in fluconazole resistant isolate (CN4969HR) and fluconazole susceptible isolates (H99: standard strain of *C. neoformans*, CN4969S and CN4901) were characterized. These four isolates belonged to serotype A (*C. neoformans* var. *grubii*) and mating type α as determined by PCR. Analysis of the 14α-lanosterol demethylase gene (*ERG11*) showed a point mutation responsible for the amino acid substitution G484S in CN4969S and CN4969HR comparing with H99 and CN4901. This result indicated that the amino acid substitution G484S may play a role in fluconazole resistant phenotype. It also supports the possibility that all cells in the heteroresistant population carry the genetic marker for resistance, but phenotypic expression of such resistance occurs in a very small fraction of the population. Analysis by the RT-PCR showed an increase at least 2-fold in both *ERG11* and *MDR1* expression levels in fluconazole-resistant (CN4969HR) isolate comparing with fluconazole susceptible isolates (H99, CN4901 and CN4969S), but *AFR1* gene expression level in CN4969HR was equivalent to the expression in H99 or CN4901 or CN4969S. Analysis of point mutation and RT-PCR suggest that molecular mechanisms involving drug efflux and alterations in the structure or cellular amount of lanosterol 14α- demethylase may play a role in the resistance to fluconazole.

This study revealed the antifungal susceptibility profiles and mechanism of fluconazole resistance in *C. neoformans* isolates in Chiang Mai. It may provide the information necessary to predict clinical outcome of treatment of this infection, a guide for selecting appropriate doses of these agents to find suitable clinical management strategies for the treatment of *C. neoformans* infection in the future.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ บทบาทของยีน *ERG11 AFR1* และ *MDR1* ของเชื้อคริปโตคอคคัส นีโอฟอร์แมนส์ ในการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล

ผู้เขียน นางสุวรรณี กีรติวาสี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. พจนา ศรีบุรี ประธานกรรมการ

รศ. ประสิทธิ์ ธราวิจิตรกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ทั้งหมด 190 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 166 ไอโซเลท จากสิ่งแวดล้อมในจังหวัดน่าน จำนวน 24 ไอโซเลท นำมาทดสอบกับยา แอมโฟเทอริซินบี ฟลูโคนาโซล อิทราโคนาโซล และ คีโตโคนาโซล ตรวจหาค่าความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธีมาตรฐานบรอทไมโครไดลูชั่น (M27-A2) ของ NCCLS พบว่า *C. neoformans* ทั้ง 190 ไอโซเลทไวต่อยาทั้ง 4 ชนิดที่ทดสอบ ค่าความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ร้อยละ 50 (MIC50) และยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ร้อยละ 90 (MIC90) ของยาแอมโฟเทอริซินบี ฟลูโคนาโซล อิทราโคนาโซล และ คีโตโคนาโซลเป็น 0.5 และ 1 ไมโครกรัม/มล. 2 และ 4 ไมโครกรัม/มล. 0.03 และ 0.06 ไมโครกรัม/ มล. และ 0.06 และ 0.125 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ไม่พบเชื้อสเตรนที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล

เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานของเชื้อ *C. neoformans* สเตรนที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลแบบเฮเทอโรรีซิสแตนท์ (heteroresistance)ในประเทศอื่นๆ เพื่อตรวจหาการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลแบบเฮทเทอโรรีซิสแตนท์ในไอโซเลทที่แยกได้จากภาคเหนือเหล่านี้ จึงคัดเลือกเชื้อจำนวนทั้งหมด 14 ไอโซเลท ที่มีค่า MIC ของยาฟลูโคนาโซล อยู่ระหว่าง 8 ถึง 16 ไมโครกรัม/มล. มาตรวจคัดกรอง ลักษณะการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลแบบเฮทเทอโรรีซิสแตนท์ ดูได้จากความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 37°ซ บนอาหารวุ้น potato dextrose ที่ผสมยาฟลูโคนาโซล 64 ไมโครกรัม/มล. จาก *C. neoformans* จำนวน 14 ไอโซเลทที่ทดสอบ มีเชื้อจากผู้ป่วย 1 ไอโซเลท (CN4969) ที่แสดงลักษณะที่แตกต่างกัน (heterogeneity) ในการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล กลุ่มประชากรย่อยของไอโซเลทนี้ (CN4969HR) ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ บนอาหารวุ้น potato dextrose ที่ผสมยาฟลูโคนาโซล 64 ไมโครกรัม/มล. แสดงลักษณะการดื้อต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยาฟลูโคนาโซล (MIC ≥ 64 ไมโครกรัม/มล. โดยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น และ ≥ 256 ไมโครกรัม/มล. โดยวิธี E-test) ประชากรย่อยอีกกลุ่มหนึ่ง (CN4969S) แสดงลักษณะการไวต่อยาฟลูโคนาโซล (MIC = 8 ไมโครกรัม/มล. โดยวิธีบรอทไมโครไดลูชั่น และวิธี E-test) การศึกษานี้แสดงว่า มีกลุ่มประชากรของ *C. neoformans* ที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซลแบบเฮทเทอโรรีซิสแตนท์ในเชื้อจากผู้ป่วยทางภาคเหนือของประเทศไทย

เพื่อให้เข้าใจในกลไกระดับโมเลกุลของการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะของยีนดื้อยา (*ERG11*; lanosterol 14α-demethylase gene, *AFR1*; Antifungal resistance 1 gene และ *MDR1*; Multidrug resistance1 gene) ในไอโซเลทที่ดื้อยาฟลูโคนาโซล (CN4969HR) และไอโซเลทที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซล (H99: สเตรนมาตรฐานของเชื้อ *C. neoformans*, CN4969S และ CN4901) เชื้อทั้งสี่ไอโซเลทจัดอยู่ในซีโรไทป์เอ (*C. neoformans* var. *grubii*) และเมทติ้งไทป์แอลฟ่า เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ การวิเคราะห์ยีน lanosterol 14α-demethylase (*ERG11*) พบการกลายพันธุ์แบบจุด (point mutation) เป็นการแทนที่กรดอะมิโนไกลซีนที่ตำแหน่ง 484 ด้วยซีรีน (G484S) ใน CN4969S และ CN4969HR เทียบกับ H99 และ CN4901 ผลการทดสอบนี้ชี้ให้เห็นว่าการแทนที่กรดอะมิโนไกลซีนที่ตำแหน่ง 484 ด้วยซีรีน อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแสดงออกในการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล ทั้งยังสนับสนุนความเป็นไปได้ที่เซลล์ทั้งหมดในกลุ่มประชากรที่เป็นเฮทเทอโรรีซิสแตนท์มีเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา (genetic marker) แต่ลักษณะที่แสดงออกของการดื้อยานั้นเกิดขึ้นในจำนวนประชากรที่น้อยมาก

การวิเคราะห์ด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (RT-PCR)แสดงว่ามีการแสดงออกของยีน (expression) ทั้ง *ERG11* และ *MDR1* เพิ่มขึ้นอย่างน้อยสองเท่าในไอโซเลทที่ดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล (CN4969HR) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทที่ไวต่อยาฟลูโคนาโซล (H99, CN4969S และ CN4901) แต่การแสดงออกของยีน *AFR1* ใน CN4969HR เท่ากับใน H99, CN4901 และ CN4969S การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในลำดับกรดอะมิโนเพียงหนึ่งตำแหน่งและอาร์ที-พีซีอาร์บ่งบอกถึงกลไกทางโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการนำยาออกจากเซลล์และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือปริมาณของเอนไซม์ lanosterol 14α-demethylase ของเซลล์ที่อาจจะมีบทบาทในการดื้อต่อยาฟลูโคนาโซล

การศึกษานี้แสดงข้อมูลโดยรวมของความไวต่อยาต้านเชื้อราและกลไกการดื้อยาฟลูโคนาโซลในเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งอาจจะเป็นข้อมูลที่จำเป็นในการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พยากรณ์ผลทางคลินิกที่ได้จากการรักษาโรคติดเชื้อรานี้ และอาจจะเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาเหล่านี้ในปริมาณที่พอเหมาะ เพื่อหากลยุทธการรักษาทางคลินิกที่เหมาะสมสำหรับรักษาการติดเชื้อ *C. neoformans* ในอนาคต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved