

Thesis Title	Comparison of Putative Virulence Factors Between <i>Candida dubliniensis</i> and <i>Candida albicans</i> from Patients with Candidiasis	
Author	Mr. Prueksharawuth Jaksuay	
Degree	Master of Science (Microbiology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Pojana Sriburee	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Sirida Youngchim	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Surawut Pongsiriwet	Co-advisor

ABSTRACT

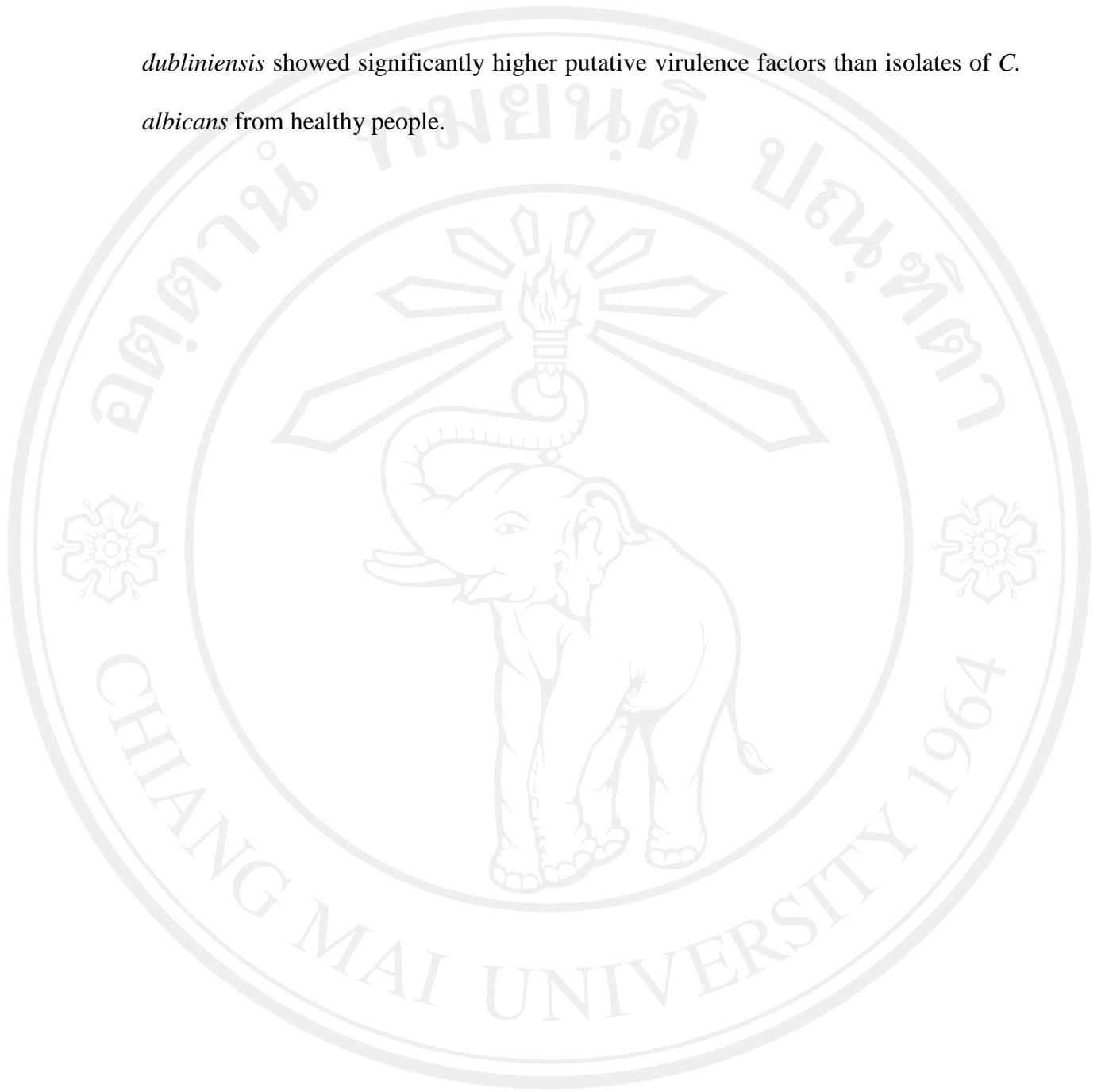
Candida dubliniensis is a causative agent of candidiasis which occurs in immunocompromised individuals especially in most patients with HIV-infection. *C. dubliniensis* shares many phenotypic features with *Candida albicans* causing misidentification in mycological laboratory. The objective of this study was to identify *C. dubliniensis* among 602 yeast isolates by using phenotypic and genotypic methods. Phenotypic methods used to distinguish *C. dubliniensis* from *C. albicans* are the inability to grow at 43°C, positive assimilation test for glycerol but not for xylose and methyl-alpha-D-glucoside and the production of abundant chlamydospores on glutinous rice tween agar at 25°C. Eleven of 602 isolates (1.8%) showed similar phenotypic characteristics as the standard strain of *C. dubliniensis*. Other 591 isolates (98.2%) showed phenotypic features of *C. albicans* e.g. the ability to grow at 43°C, positive assimilation tests for xylose and methyl-alpha-D-glucoside but not for

glycerol and the production of few chlamydospores on glutinous rice tween agar at 25°C. Identification of *C. dubliniensis* was confirmed by PCR using 2 pair primers, the universal fungal primers (ITS1 and ITS4) and the *C. dubliniensis*-specific primers for *ACT1* intron gene (DUBF and DUBR). Those 11 suspected isolates of *C. dubliniensis* produced amplified products of approximately 540 bp and 288 bp, respectively. Comparative analysis of DNA sequences from specific PCR products showed 100% identity to the *ACT1* intron gene of *C. dubliniensis*.

In addition, the putative virulence factors (e.g. proteinase activity, phospholipase activity and phenotypic switching) of those 11 clinical isolates of *C. dubliniensis*, 30 clinical isolates of *C. albicans* and 30 isolates of *C. albicans* from healthy people were compared. Most of *C. dubliniensis* and *C. albicans* isolated from patients showed very strong proteinase activity while most of *C. albicans* isolated from healthy people showed negative activity. Determination on phospholipase activity, *C. dubliniensis* and *C. albicans* isolated from patients showed stronger phospholipase activity than those of *C. albicans* isolated from healthy people. Isolates of *C. dubliniensis* and *C. albicans* from patients showed higher frequencies of primary, secondary and reversible phenotypic switching than isolates of *C. albicans* from healthy people.

This study revealed that using phenotypic and PCR method, the prevalence of *C. dubliniensis* is 1.8% among clinical isolates of *C. albicans* in Chiang Mai providing the epidemiological information of this organism in this area of Thailand. These clinical isolates of *C. dubliniensis* showed similar putative virulence factors such as proteinase, phospholipase activity, and frequency of phenotypic switching to clinical isolates of *C. albicans*. However, both clinical isolates of *C. albicans* and *C.*

dubliniensis showed significantly higher putative virulence factors than isolates of *C. albicans* from healthy people.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคที่เป็นไปได้ระหว่างเชื้อ <i>Candida dubliniensis</i> กับ <i>Candida albicans</i> จากผู้ป่วยโรค Candidiasis	
ผู้เขียน	นายพฤษศรารุช จักสวຍ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. พงนา ศรีบุรี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ทพ. สุรวุฒน์ พงษ์ศิริเวทย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. สิริดา ยังนิม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Candida dubliniensis* เป็นสาเหตุของโรค candidiasis ในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องส่วนใหญ่เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวี เชื้อ *C. dubliniensis* มีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *Candida albicans* จึงทำให้มีจำแนกชนิดผิดพลาดในห้องปฏิบัติการเชื้อรา วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อที่จะจำแนกเชื้อ *C. dubliniensis* จากยีสต์จำนวน 602 ไอโซเลท โดยวิธีทางฟีโนไทป์และวิธีทางจีโนไทป์ วิธีทางฟีโนไทป์ที่ใช้แยกเชื้อ *C. dubliniensis* ออกจาก *C. albicans* ได้แก่ การไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 43 °ซ ให้ผลบวกในปฏิกิริยา assimilation กับ glycerol แต่ให้ผลลบกับ xylose และ methyl-alpha-D-glucoside และการสร้าง chlamydospore จำนวนมากเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น glutinous rice tween ที่อุณหภูมิ 25 °ซ จากเชื้อ 602 ไอโซเลท พบว่ามี 11 ไอโซเลท (ร้อยละ 1.8) แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์เช่นเดียวกับ *C. dubliniensis* สายพันธุ์มาตรฐาน อีก 591 ไอโซเลท (ร้อยละ 98.2) แสดงลักษณะทางฟีโนไทป์เช่นเดียวกับ *C. albicans* ได้แก่ สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 43 °ซ ให้ผลบวกในปฏิกิริยา assimilation กับ xylose และ methyl-alpha-D-glucoside ให้ผลลบกับ glycerol สร้าง chlamydospore จำนวนน้อยบนอาหารวุ้น glutinous rice tween ที่อุณหภูมิ 25 °ซ ได้ทำการยืนยันผลการทดสอบทางฟีโนไทป์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ คู่แรกเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อราทุกชนิด (ITS1 และ ITS4) ส่วนไพรเมอร์คู่ที่สองเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *ACT1* intron (DUBF และ DUBR) ของเชื้อ *C. dubliniensis* ผลการทดสอบพบว่าทั้ง 11 (1.8%) ไอโซเลทที่คาดว่าจะเป็เชื้อ *C. dubliniensis* ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 540 คู่เบส และ 288 คู่เบส โดยลำดับ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ACT1* intron ของ *C. dubliniensis* ร้อยละ 100.

นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบปัจจัยในการก่อโรคที่เป็นไปได้ (ได้แก่ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ proteinase ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ phospholipase และ ความถี่ในการเกิด phenotypic switching) ของเชื้อ *C. dubliniensis* จำนวน 11 ไอโซเลทที่แยกได้จากผู้ป่วย เชื้อ *C. albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 30 ไอโซเลทและเชื้อ *C. albicans* ที่แยกได้จากคนปกติจำนวน 30 ไอโซเลท พบว่าส่วนใหญ่ เชื้อ *C. dubliniensis* และ เชื้อ *C. albicans* ที่แยกจากผู้ป่วยมีความสามารถระดับสูงในการสร้างเอนไซม์ proteinase (very strong proteinase activity) ส่วนเชื้อ *C. albicans* จากคนปกติส่วนใหญ่ให้ผลลบ การตรวจหาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ phospholipase เชื้อ *C. dubliniensis* และ เชื้อ *C. albicans* ที่แยกจากผู้ป่วยมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ phospholipase ได้ดีกว่าเชื้อ *C. albicans* ที่แยกจากคนปกติ และแสดงความถี่ในการเกิด phenotypic switching ทั้งแบบ primary, secondary และ reverse switching ได้ดีกว่า *C. albicans* ที่แยกได้จากคนปกติ

การศึกษานี้ทำให้ทราบว่า การใช้วิธีฟิโนไทป์และวิธีพีซีอาร์ ทำให้ทราบอุบัติการณ์ของเชื้อ *C. dubliniensis* จากผู้ป่วยโรค candidiasis ในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย คิดเป็นร้อยละ 1.8 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *C. dubliniensis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรค candidiasis มีปัจจัยในการก่อโรคที่เป็นไปได้ เช่น proteinase activity, phospholipase activity และความถี่ของการเกิด phenotypic switching เหมือนกับเชื้อ *C. albicans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรค candidiasis แต่จะมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเชื้อ *C. albicans* ที่แยกได้จากคนปกติ