

รูปแบบของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแมนโนโปรตีน

ที่พบในผู้ป่วย Candidiasis และคนปกติ

นางสาวพัชรี กัมมารเจษฎากุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0601-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ANTIBODY PATTERNS SPECIFIC TO  
MANNOPROTEIN IN CANDIDIASIS  
AND NORMAL HOST**

**Miss Patcharee Kammarnjassadakul**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology  
Inter – Department of Medical Microbiology**

**Graduate school**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2001**

**ISBN 974 – 03 – 0601 - 2**

นางสาวพัชรี กัมมารเจษฎากุล : รูปแบบของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแมนโนโปรตีนที่พบในผู้ป่วย Candidiasis และคนปกติ (ANTIBODY PATTERNS SPECIFIC TO MANNOPROTEIN IN CANDIDIASIS AND NORMAL HOST)

อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อริยา จินตามพร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และ ศ.นพ.ดร.ประพันธ์ ภาณุภาค, 93 หน้า, ISBN 974-03-0601-2

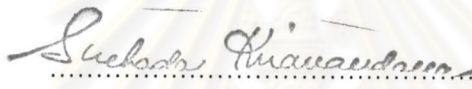
รูปแบบของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแมนโนโปรตีนในโรค Candidiasis ศึกษาโดยใช้ตัวอย่างน้ำเหลืองจากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV ที่มีอาการของ oral candidiasis และมีจำนวน  $CD4^+T$  - lymphocyte  $\leq 200$  เซลล์/ลบ.มม. จำนวน 15 ตัวอย่าง และ ผู้ป่วย systemic candidiasis จำนวน 5 ตัวอย่าง ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กลุ่มควบคุมสำหรับการศึกษารังนี้ได้จากนิสิตคณะแพทยศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 30 ตัวอย่าง การตรวจหาและวัดระดับของภูมิคุ้มกันชนิด IgG ที่จำเพาะต่อแมนโนโปรตีนในการศึกษานี้ใช้วิธี Enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) และจากการทดสอบพบว่า กลุ่มคนปกติร้อยละ 87 และผู้ป่วย oral candidiasis ร้อยละ 93 มีค่าเฉลี่ยของระดับ IgG ที่พบ  $\leq 1:100$  ขณะที่กลุ่มผู้ป่วย systemic candidiasis ทั้งหมด (ร้อยละ 100) พบระดับของ IgG  $\geq 1:200$  จากนั้นได้ทำการศึกษาหาส่วนประกอบของแมนโนโปรตีนโดยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) พบว่าประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างกันอย่างน้อย 12 ชนิด ได้แก่ 52 50.5 46.5 45.5 43.5 42 38 36.5 32.5 29 25 และ 22.5 กิโลดาลตัน เมื่อนำตัวอย่างน้ำเหลืองมาศึกษาถึงคุณสมบัติที่จำเพาะของ IgG ต่อโปรตีนแต่ละชนิดโดยวิธี Western blot พบว่า ในกลุ่มคนปกติพบ 15 รูปแบบ กลุ่มผู้ป่วย oral candidiasis พบ 12 รูปแบบ และผู้ป่วย systemic candidiasis พบ 5 รูปแบบ ขนาดของโปรตีนที่พบได้ในทุกกลุ่มคือ 46.5 43.5 และ 36.5 กิโลดาลตัน และจากการศึกษารังนี้มีขนาดของโปรตีนที่น่าสนใจ คือ ขนาด 52 50.5 และ 29 กิโลดาลตัน โดยโปรตีนที่มีขนาด 52 และ 50.5 กิโลดาลตัน พบได้ร้อยละ 60 ในผู้ป่วย systemic candidiasis ในขณะที่ในกลุ่มผู้ป่วย oral candidiasis และคนปกติพบได้บ้าง ( $\leq$  ร้อยละ 13.33) ส่วนขนาด 29 กิโลดาลตัน ตรวจพบได้เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วย oral candidiasis เท่านั้น (ร้อยละ 20) ดังนั้นผลจากการศึกษาในครั้งนีชี้ให้เห็นว่า โปรตีนที่มีขนาด 52 และ 50.5 กิโลดาลตัน อาจจะเป็นตัวชี้บ่งและช่วยในการวินิจฉัยโรค systemic candidiasis ส่วนโปรตีนขนาด 29 กิโลดาลตัน น่าจะมีความสำคัญในโรค oral candidiasis

ภาควิชา... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย... ลายมือชื่อนิสิต... นศ. พวี... กัมมารเจษฎากุล...  
สาขาวิชา... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา... อริยา จินตามพร...  
ปีการศึกษา... 2544... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม... ภาวพันธ์ ภัทรโกศล...  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม... ประพันธ์ ภาณุภาค...

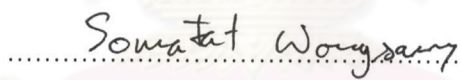
Thesis Title                      Antibody patterns specific to mannoprotein in candidiasis  
and normal host  
By                                      Miss Patcharee Kummarnjassadakul  
Field of Study                      Medical Microbiology  
Thesis Advisor                      Assist. Prof. Ariya Chindamporn, Ph.D.  
Thesis Co-advisor                      Assoc. Prof. Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.  
  
Prof. Praphan Phanuphak, MD., Ph.D.

---

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

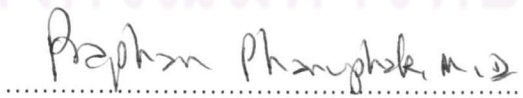
  
..... Dean of Graduate School  
(Prof. Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

  
..... Chairman  
(Assoc. Prof. Somatat Wongsawang, DVM., Dr. med. vet.)

  
..... Thesis Advisor  
(Assist. Prof. Ariya Chindamporn, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-advisor  
(Assoc. Prof. Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-advisor  
(Prof. Praphan Phanuphak, MD., Ph.D.)

  
..... Member  
(Assist. Prof. Srisurang Tanimavanich, Ph.D.)



4175230630 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: *CANDIDA* / *CANDIDA ALBICANS* / IMMUNOBLOT/  
ELISA / ANTIBODY

PATCHAREE KUMMARNJASSADAKUL : ANTIBODY  
PATTERNS SPECIFIC TO MANNOPROTEIN IN

CANDIDIASIS AND NORMAL HOST : THESIS ADVISOR :  
ASSIST. PROF. ARIYA CHINDAMPORN, Ph.D., THESIS CO –  
ADVISOR : ASSOC. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL,  
Ph.D. AND PROF. PRAPHAN PHANUPHAK, M.D., Ph.D.

93 pp. ISBN 974 – 03 – 0601 – 2

To study the antibody profiles to mannoprotein in candidiasis, fifteen sera of HIV - infected patients with oral candidiasis and five sera with systemic candidiasis who visited King Chulalongkorn Memorial Hospital were recruited. Thirty normal healthy host sera obtained from medical students and staffs of faculty of Medicine, Chulalongkorn University were used as control group. All HIV – infected patients had CD4<sup>+</sup> T cells number  $\leq 200$  cells/mm<sup>3</sup>. Screening for the presence of *Candida* specific IgG antibody was done by using Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). While titers of *Candida* specific IgG in 93% of the patients with oral candidiasis and 83% of the control group are  $\leq 1:100$ , the titers of all patients with systemic candidiasis are  $\geq 1:200$ . Determination of mannoprotein by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) revealed that it is composed of at least 12 antigenic components, 52, 50.5, 46.5, 45.5, 43.5, 42, 38, 36.5, 32.5, 29, 25, 22.5 kilodaltons. All sera were analysed the specificity against mannoprotein by Western blot assay. The numbers of reactive band from each sera were classified and set as pattern. In healthy group, there were 15 patterns while oral candidiasis group and systemic group were found 12 and 5 patterns, respectively. The most common antigenic components found in almost all sera of any group were 46.5, 43.5 and 36.5 kilodaltons. Interestingly, antigenic component molecular weight of 52 kilodalton was detected in 60% of systemic candidiasis compared to only 6.7% in oral candidiasis group and none (0%) in healthy host. And antigenic component molecular weight of 29 kilodalton was detected in 20% of oral candidiasis and none (0%) in systemic candidiasis and healthy host. Another component of 50.5 kilodalton was also found in 60% of systemic candidiasis and few in oral candidiasis group (13.3%) and healthy host (9.1%). In conclusion, this study revealed 2 components, 52 and 50.5 kilodalton might be remarkable antigenic markers for differential diagnosis of systemic candidiasis whereas 29 kilodalton might be important antigenic markers for differential diagnosis of oral candidiasis.

Department Medical Microbiology  
Field of Study Medical Microbiology  
Academic year 2001

Student's signature... Patcharee Kummarnjassadakul  
Advisor's signature... Ariya Chindamporn  
Co – advisor's signature... Parvapan Bhattarakosol  
Co – advisor's signature... Praphan Phanuphak, M.D.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author wished to express her deepest gratitude to Assist. Prof. Ariya Chindamporn, Ph.D., of Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, her advisor, Assoc. Prof. Parvapan Bhattarakosol, Ph.D., of Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Professor Praphan Phanuphak, MD., Ph.D., of Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, her co – advisor for their kind excellent supervision and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism, guidance and encouragement throughout the period of the study.

I also would like to thanks to Assoc. Prof. Thada Seubhlinwong, MD., and her staff, of Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their kindness in guidance throughout the laboratory and providing the beneficial instrument for protein assay. Assoc. Prof. Somchai Jongwuthivej, MD., Ph.D., of Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his kindness in guidance and supporting throughout this study, and Professor Toshio Kanbe, Ph.D., Laboratory of Medical Mycology, Research Institute for Disease Mechanism and Control, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan, for his kindness in providing the mannoprotein antigens using in this study.

Most sincerely, the investigator is deeply indepted to Mr. Somboon Nookai and all staffs at HIV – NAT project, AIDS research center, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand and all staffs of Mycology laboratory, of Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital for their help in collecting the specimens. The author wish to extend her acknowledgement to all staffs of Department of Microbiology, King Chulalongkorn Memorial Hospital, for their kindness and help.

Finally, I am grateful to my family for their kind supporting and warm encouragement, which enable me to fulfil this study.

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. OBJECTIVES.....	7
III. REVIEW LITERATURE.....	8
Biology.....	8
Morphology.....	10
Pathogenesis of Candidiasis.....	12
Clinical disease.....	12
Virulence factors.....	14
Cell wall structure.....	20
Immune response and immunodiagnosis.....	29
IV. MATERIALS AND METHODS.....	34



Study groups.....	34
Specimen collection.....	35
<i>Candida</i> antigens.....	35
Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA).....	36
Procedure of sodium dodecyl sulfate polyacrlyamide gel Electrophoresis (SDS – PAGE).....	37
Procedure for staining of the gel (Coomassie brilliant blue R)...	38
Blotting.....	39
Procedure of Western blotting.....	40
Procedure for staining of immobilon membrane (amido black)...	41
Procedure for purified IgG antibody.....	41
Protein Assay.....	42
Statistical Analysis.....	44
V. RESULTS.....	46
Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA).....	42
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE).....	50
Immunoblotting.....	52
The patterns of human IgG antibody against mannoprotein antigen in healthy individuals, HOC, systemic candidiasis patients and other fungal infection patients.....	53
Purify immunoglobulin G antibody (IgG) from pooled serum by HiTrap rProtein A.....	58



	Page
VI. DISCUSSION.....	62
VII. CONCLUSION.....	68
REFERENCES.....	70
APPENDIX.....	88
CURRICULUM VITAE.....	93



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Most commonly isolated nosocomial pathogens hospital – wide And in ICUs: National Nosocomial Infections Surveillance system, October 1986 – December 1990.....	2
2. Distribution of fungi causing nosocomial infections : National National Nosocomial Infections Surveillance system, January 1980 – April 1990.....	3
3. Proportions of systemic candidal infections due to particular species, according to data from various institutions.....	4
4. Adhesins of <i>Candida albicans</i> and <i>Candida glabrata</i> .....	17
5. Transcriptional proteins of <i>Candida albicans</i> and morphogenesis..	19
6. Antibody response to <i>Candida albicans</i> cell wall proteins and mannoproteins.....	30
7. OD. at wavelenght 595 nm. of protein standard and mannoprotein antigen was measured by spectrophotometer.....	43
8. Characterization of mannoprotein antigen was recognized by human sera IgG antibody.....	57
9. The optical density value at wavelenght 280 nm. of solutions in each tubes.....	59

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Blastoconidia and pseudohyphae in exudate.....	11
2. Chlamydoconidia.....	11
3. Young culture forms germ tubes when placed in serum for 3 hours at 37°C.....	11
4. Generalized structure for yeast mannoprotein as first proposed by Ballou (1976).....	24
5. Cell wall (CW) structure.....	26
6. Schematic diagram of the cell wall (CW) structure of <i>C. albicans</i> , showing the presence of different layers enriched in particular components.....	28
7. Principle of indirect ELISA.....	37
8. To transfer protein from gel to immobilon membrane by using Electrophoretic Transfer Cell.....	40
9. Using HiTrap rProtein A Sepharose with a syringe.....	42
10. Standard curve of protein assay.....	44
11. The mannoprotein antigen titration using rabbit serum consisting of anti- <i>Candida</i> antibody.....	46
12. The antibody titers of IgG antibody against mannoprotein antigen in healthy individuals (n=30), age ranged 17 – 25 years old.....	48
13. The antibody titers of IgG antibody against mannoprotein antigen in HOC (n=15), age ranged 22 – 43 years old.....	48
14. The antibody titers of IgG antibody against mannoprotein antigen in systemic candidiasis patients (n=5), age ranged 3 – 60 years old.....	49



Figure	Page
15. The antibody titers of IgG antibody against mannoprotein antigen in other fungal infection patients (n=9), age ranged 4 – 70 years old.....	49
16. SDS – PAGE of mannoprotein antigen.....	50
17. The protein components on the membrane after blotting.....	51
18. Optimization of rabbit anti – human IgG conjugated with horseradish peroxidase.....	52
19. Immunoblot of mannoprotein antigen was recognized by human IgG.....	53
20. The antibody patterns of Healthy individuals, HOC, Systemic candidiasis patients and Other fungal infection patients.....	54
21. IgG immune response of 22 healthy individuals, 15 HOC and 5 systemic candidiasis patients against mannoprotein antigen as revealed by Western blotting analysis.....	56
22. IgG immune response of 22 healthy individuals, 15 HOC, 5 systemic candidiasis patients and 9 other fungal infection patients against mannoprotein antigen as revealed by Western blotting analysis.....	58
23. SDS – PAGE of purification of immunoglobulin G of human sera from pooled sera on HiTrap rProtein A Sepharose, with a 95% recovery of highly purified immunoglobulin G antibody.....	60
24. Immunoblot of mannoprotein antigen was recognized by IgG antibody and human sera.....	62

## ABBREVIATIONS

° C	=	degree celsius
µg	=	microgram
µl	=	microliter
A	=	absorbance
Ab	=	antibody
Ag	=	antigen
AIDS	=	acquired immunodeficiency syndrome
API	=	analytical profile index
Asn	=	asparagine
C.	=	<i>Candida</i>
CMI	=	cell – mediated immunity
CMIR	=	cell – mediated immune response
CW	=	cell wall
DW	=	distilled water
EIA	=	enzyme immunoassay
ELISA	=	enzyme – linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	=	<i>et alii</i>
g	=	gram
GPS	=	glycosyl phosphatidylinositol
HIM	=	humoral immunity
HIMR	=	humoral immune response
HIV – NAT	=	HIV – Netherland Australia Thailand

HMW – MP	=	high molecular weight – mannoprotein
HOC	=	HIV – infected patient with oral candidiasis
hr	=	hour
i.e.	=	id est
IF	=	indirect immunofluorescent
IgA	=	immunoglobulin A
IgE	=	immunoglobulin E
IgG	=	immunoglobulin G
IgM	=	immunoglobulin M
M	=	molar
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
NNIS	=	nosocomial infection surveillance
<i>P.</i>	=	<i>Pseudomonas</i>
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cell
<i>PL</i>	=	phospholipase
PM	=	plasma membrane
PMNs	=	polymorphoneuclear cells
RIA	=	radioimmunoassay
<i>S.</i>	=	<i>Staphylococcus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	=	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>SAP</i>	=	creted asparatyl proteinases



SDS – PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel  
electrophoresis

SDS = sodium dodecyl sulfate

T – cells = Thymus – derived lymphocytes

Thr = threonine

USA = United State of America



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย