

ผลของการให้ สารโมเนลลา ไทมิมีเรียม จี 30 ที่มีต่อ

แมคโครฟาจ ในการป้องกัน ไซท์ยฟอยด์ในหนูขาว



เรือโทหญิง ทิพย์วราภรณ์ สุภาพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974 - 568 - 309 - 4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013078

I 1029284b

EFFECT OF SALMONELLA TYPHIMURIUM G 30 ON MACROPHAGES

IN THE PROTECTION AGAINST MOUSE TYPHOID

LIEUTENANT JUNIOR GRADE (W) THIPPAWAN SUPAPONGSE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

INTER - DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY

GRADUATE SCHOOL

CHULALONGKORN UNIVERSITY

1987

ISBN 974 - 568 - 309 - 4

Thesis Title                      Effect of Salmonella typhimurium G<sub>30</sub> on  
Macrophages in the Protection against Mouse  
Typhoid  
By                                      Lieutenant Junior Grade (w) Thippawan Supapongse  
Inter - Department              Medical Microbiology  
Thesis Advisor                    Instructor Pakathip Reynolds , M.Sc.  
Thesis Co - Advisor              Professor B.L. Reynolds , Ph.D.



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

*Thavorn Vajrabhaya*  
.....  
(Professor Thavorn Vajrabhaya , Ph.D.)  
Dean of Graduate School

Thesis Committee

*Santi Thoongsuwan*  
..... Chairman  
(Associate Professor Santi Thoongsuwan , Ph.D.)

*Pakathip Reynolds*  
..... Member  
(Instructor Pakathip Reynolds , M.Sc.)

*B.L. Reynolds*  
..... Member  
(Professor B.L. Reynolds , Ph.D.)

*Virapong Prachayasittikul*  
..... Member  
(Assistant Professor Virapong Prachayasittikul , Ph.D.)

ทิพย์วรรณ สุภาพงษ์, เรือโทหญิง : ผลของการให้ สาลโมเนลลา ไทฟิมูเรียม G 30 ที่มี  
ต่อแมคโครฟาจ ในการป้องกันไข้ทัยฟอยด์ในหนูขาว (EFFECT OF SALMONELLA TYPHIMU-  
RIUM G 30 ON MACROPHAGES IN THE PROTECTION AGAINST MOUSE TYPHOID)  
อ.ที่ปรึกษา : อ.ศกาศทิพย์ เรโนลด์, 113 หน้า.

งานที่ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ เพื่อที่จะหาปัจจัยในการป้องกัน intracellular parasites  
ที่สามารถ penetrate เข้าไปในผนังลำไส้ เช่น Salmonella typhi เราใช้ไข้ทัยฟอยด์ในหนูขาวเป็น  
แบบในการศึกษา ซึ่งงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ เพื่อที่จะหาผลในการป้องกันไข้ทัยฟอยด์ในหนูขาวเมื่อให้วัคซีน  
ชนิดกิน Salmonella typhimurium G 30 โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัคซีนชนิดกิน G 30 นี้สามารถกระตุ้นภูมิ-  
คุ้มกันโดยทำให้ macrophages ที่อยู่ใน Peyer's patches มีการเพิ่มจำนวนและมีความสามารถในการ  
กำจัดแบคทีเรียดังกล่าว (Peyer's patches นี้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ Gut Associated Lymphoid  
Tissue)

สำหรับ Mouse protection test ได้ศึกษาเพื่อทดสอบความสามารถในการป้องกันไข้ทัย-  
ฟอยด์ในหนูขาวของวัคซีนชนิดกิน G 30 การที่ให้วัคซีนชนิดกิน G 30 ไม่เพียงแต่เพิ่มจำนวนของ Peyer's  
patch macrophages มากกว่าระดับปกติ แต่ค่า index ของ intracellular killing ได้เพิ่มขึ้น  
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ซึ่งผลของทั้งสองอย่างนี้สอดคล้องกับผลในการป้องกันไข้ทัยฟอยด์ในหนูขาวของ  
วัคซีนชนิดกิน G 30 ด้วย

การที่ macrophages ถูกกระตุ้นมากกว่าระดับปกติ ได้จากการยับยั้ง esterase และการ  
เพิ่มของเซลล์ที่ ingest latex particles สำหรับ in vitro intracellular killing assay  
นั้นจำเป็นต้องใช้ specific antibody ซึ่ง specific antibody ไม่เพียงแต่ใช้ในการ opsoniza-  
tion แต่ใช้ใน intracellular killing ด้วย

การศึกษาทั้งหมดนี้ชี้ให้เห็นว่า การให้หนูขาวพันธุ์ BALB/cJ กินวัคซีนชนิดกิน G 30 สามารถ  
ป้องกันไข้ทัยฟอยด์ในหนูขาวได้เป็นอย่างดี เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของ Peyer's patch macrophages  
และการเพิ่มใน intracellular killing ของแบคทีเรียดังกล่าวในการมี specific antibody โดย  
สรุปเราพบว่าการกระตุ้น local antibacterial CMI ในหนูขาวในการป้องกันไข้ทัยฟอยด์ในหนูขาว  
หลังจากให้กินวัคซีนชนิดกิน G 30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาและวิทยาการแพทย์.....  
สาขาวิชา ..... สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาและวิทยาการแพทย์.....  
ปีการศึกษา 2530 .....

ลายมือชื่อนิสิต ..... จ.ท.หญิง ทิพย์วรรณ สุภาพงษ์ ร.น.  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... ศกาศทิพย์ เรโนลด์ .....

THIPPAWAN SUPAPONGSE, LIEUTENANT JUNIOR GRADE (W) : EFFECT OF SALMONELLA TYPHIMURIUM G 30 ON MACROPHAGES IN THE PROTECTION AGAINST MOUSE TYPHOID. THESIS ADVISOR : INST. PAKATHIP REYNOLDS, M.Sc. 113 PP.

The work reported in this thesis has been undertaken to investigate some of the factors which protect a host against those microbial intracellular parasites, which are able to penetrate the intestinal epithelium, such as Salmonella typhi. We have used "mouse typhoid" as our model. The work is aimed to determine the effect of oral immunization by the avirulent G 30 strain of S. typhimurium C 5 in protection against "mouse typhoid". In particular, it has looked at the proliferation of macrophages in the Peyer's patches (PP), an important component of the gut associated lymphatic tissue (GALT) following oral immunization of BALB/cJ mice with G 30 and the ability of these cells to kill ingested S. typhimurium C 5.

Mouse protection tests were performed concomitantly to demonstrate the protective capacity of the orally administered G 30. The results show that oral feeding of G 30 not only increased the numbers of Peyer's patch macrophages, far above the normal level, but that then index of intracellular killing was also raised, most significantly. Both of these phenomena correlated with the observed protective effects of G 30.

Further, the macrophages were shown to be activated well above the normal threshold, by esterase staining and increased ingestion of latex particles. The in vitro intracellular killing assay showed an absolute requirement for specific antibody against the target parasite, not only for opsonization but also for the subsequent intracellular killing.

These findings indicate that oral feeding of G 30 to BALB/cJ mice can generate a good protection against "mouse typhoid". This appears due to an increase in the number of PP macrophages and an increase in the intracellular killing of the pathogen in the presence of specific antibody. In summary, we find a stimulation of a local antibacterial cell mediated immunity in mice to mouse typhoid, following the oral administration of the avirulent G 30 strain.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์.....  
สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์.....  
ปีการศึกษา 2530.....

ลายมือชื่อนิสิต วั.ก.หญิง กิ่งจันทน์ สาทพงษ์ ร.น.  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อรรชพร วัฒนกุล

## ACKNOWLEDGEMENT



I wish to express my gratitude to the following persons who help , support and advise me on this thesis which could not have been finished without their valuable helps and advices .

Air Vice Marshal Sahas Nagasiri , the Director General , Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) , Supreme Commander Headquarters , for his kind permission to study at the Graduate School , Chulalongkorn University for the Master' s Degree in Medical Microbiology .

My advisor , Acharn Pakathip Reynolds and my co - adviser , Professor B.L. Reynolds for their kindness , devotion , suggestion , attention and encouragement throughout my study render the successful and completeness of this thesis . I thank you and appreciated gratefully .

Colonel Pricha Singharaj M.D. , Chief , Research Division , Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) , Supreme Commander Headquarters , for the opportunities to study , kind suggestion and encouragement during the period of this study .

Colonel Pralong La -or -Ngorn , Chief , Department of Veterinary Medicine , Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) , Supreme Commander Headquarters , for kindly providing BALB/cJ which mice were used througout my study .

Associate Professor Vanna Punnarugsa M.D. ,Virology Unit , Department of Microbiology , Faculty of Medicine , Chulalongkorn University , for kindly providing Fluorescein - labeled swine anti -

rabbit immunoglobulin .

Associate Professor Kawee Pupaibul M.D. , Head of the Department of Microbiology , Faculty of Medicine , Chulalongkorn University , there this thesis was undertaken , for his kind permission to use the facilities for this study .

Miss Somrat Charnrit , Department of Preventive and Social Medicine , Faculty of Medicine , Chulalongkorn University , for her kind suggestion and best evaluation of laboratorial results in statistically analysis .

All fellow , colleagues and everyone in the Department of Faculty of Medicine , Chulalongkorn University , who had courteously assisted and provided not only facilities but also materials and constructive criticisms and beneficial advices .

Directorate of Education and Research , Supreme Commander Headquarters for the funding of this study and the committee of the Graduate School , Chulalongkorn University , for the research grant to support this study . I faithfully submit my indebtedness to them .

Sincere thanks are due to all persons in AFRIMS for providing facilities needed .

Finally , ones who are beyond my success are my parents who have given me good environments , kindly supported , understood , and encouraged all my strives to reach the goal .



## CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT .....	IV
ENGLISH ABSTRACT .....	V
ACKNOWLEDGEMENT .....	VI
CONTENTS .....	VIII
LIST OF TABLES .....	XIII
LIST OF FIGURES .....	XIV
ABBREVIATIONS .....	XV
CHAPTER .....	
I    INTRODUCTION .....	1
II   REVIEW OF LITERATURES .....	5
Pathogenesis of Salmonella Infection .....	5
Virulence Factors in Salmonella .....	5
Oral Typhoid Vaccines .....	7
1. Oral Killed Vaccines .....	7
2. Oral Live Vaccines .....	8
3. Gal E Mutant of <i>Salmonella typhimurium</i> .....	11
<i>Salmonella typhimurium</i> Resistance Genes of Inbred Mice .....	13
1. Ity : Genetics .....	13



	Page
Protective Factors Operating in the Gut ...	15
1. Innate Resistance .....	15
1.1 Gastric acidity .....	15
1.2 Peristalsis .....	16
1.3 Mucus .....	16
1.4 Normal Microflora .....	16
2. Immune Resistance .....	17
2.1 Immunoglobulin A .....	17
2.2 Other immunoglobulins .....	18
2.3 Cell - Mediated Immunity .....	19
The Immune Response to Oral Immunization ....	19
1. Gut Associated lymphoid Tissue (GALT) ..	20
1.1 Histology of Peyer' s Patches ....	21
1.2 Peyer' s Patches Macrophages ....	22
1.3 Antigen uptake by GALT .....	24
2. Antibody Responses Following Oral Immunization .....	27
3. Cell - Mediated Immune Response Following Oral Immunization .....	27
Macrophages Functions in Antimicrobial Defense .....	28
1. Mechanisms of Phagocytosis .....	28
2. Activation of Macrophages .....	31
2.1 Activating Agents of Macrophages ..	31
3. Attachment of Microbes to the Macrophage Surface .....	32
4. Phagocytosis of Microorganisms by Macrophages .....	33
5. Microbial Activities of Macrophages ...	33
<b>III MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>35</b>

	Page
<b>MATERIALS</b> .....	35
1. Experimental Animals .....	35
1.1 Mice .....	35
1.2 Rabbits .....	35
2. Strains of <u>Salmonella typhimurium</u> .....	35
2.1 Description of Strains .....	35
2.2 Strain Maintenance .....	36
2.3 Strain Propagation .....	36
<b>METHODS</b> .....	37
1. LD <sub>50</sub> Determination .....	37
2. Oral Immunization .....	37
3. Mouse Protection Test .....	37
4. Immune Serum .....	38
5. Bacterial Agglutination Test .....	39
6. Peyer' s Patches Cell Cultures .....	41
6.1 Removal of Peyer' s Patches from Mice .....	41
6.2 Extraction of Peyer' s Patches by Enzymatic Treatment .....	42
6.3 Identification of Macrophages ....	42
6.3.1 Nonspecific Esterase Staining .....	42
6.3.2 Latex Ingestion Test .....	43
7. Intracellular Killing Assay .....	43
7.1 Preparation of Peyer' s Patch Cells for Intracellular Killing Assay ...	43
7.2 Preopsonization of <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> C <sub>s</sub> .....	44
7.3 Indirect Immunofluorescent Antibody Test .....	44

	Page
7.4 In Vitro Intracellular Killing Assay .....	46
7.5 Determination of the Optimal Concentration of Immune Serum for In Vitro Intracellular Killing Assay .....	47
<b>IV RESULTS</b> .....	<b>48</b>
1. Lethal Doses for Oral Challenge .....	48
2. Mouse Protection Test .....	48
3. Immune Serum .....	51
4. Indirect Immunofluorescent Antibody Test ..	51
5. Enzymatic Extraction of Peyer's Patch Cells .....	51
6. Comparison of the Number of Macrophages in the Peyer's Patches of Mice after Feeding <u>Salmonella typhimurium</u> G <sub>30</sub> with Control Group .....	54
7. Specific Antibody Requirement for Preopsonization and Intracellular Killing Assay .....	56
8. Control Studies to Demonstrate the Intracellular Presence of <u>Salmonella typhimurium</u> C <sub>5</sub> during the Killing Assay ...	56
9. Optimal Concentration of Immune Serum for In Vitro Intracellular Killing Assay .....	57
10. Intracellular Killing of <u>Salmonella typhimurium</u> C <sub>5</sub> in Vitro by Macrophages in the Peyer's Patches of Mice .....	62

	Page
V DISCUSSION .....	67
REFERENCES .....	73
APPENDIX I .....	98
APPENDIX II .....	100
VITA .....	113



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Mouse Protection from <u>Salmonella typhimurium</u> C <sub>5</sub> Infection Afforded by Oral Vaccination with Living Cells of <u>Salmonella typhimurium</u> G <sub>30</sub> .....	50
2.	Numbers of Macrophages in Enzymatically Dissociated Peyer's Patch Cell Suspensions of Mice Immunized Orally with <u>Salmonella typhimurium</u> G <sub>30</sub> Compared with Normal Mice .....	55
3.	Intracellular Killing of <u>Salmonella typhimurium</u> C <sub>5</sub> by Peyer's Patch Macrophages .....	64
4.	Comparison of Percentage of Peyer's Patch Macrophages from Normal Mice and Peyer's Patch Macrophages from <u>Salmonella typhimurium</u> G <sub>30</sub> - Immunized Mice .....	65
5.	Comparison of Rate of in Vitro Intracellular Killing of <u>Salmonella typhimurium</u> C <sub>5</sub> at 60 Minutes by Peyer's Patch Macrophages of Mice Orally Orally Immunized <u>Salmonella typhimurium</u> G <sub>30</sub> with Normal Mice (Non - Immunized) and Van Dissel Index .....	66
6.	LD <sub>50</sub> of the challenge strain C <sub>5</sub> in the BALB/cJ Mice .....	98

## LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Pathogenesis of Murine Typhoid .....	6
2.	Schematic Representation of the Incorporation of Exogenous Galactose into the Lipopolysaccharides of gal E Mutants .....	12
3.	Diagram of Peyer's Patches Structure in the Mouse .....	25
4.	Darkly Stained Cytoplasm of a Mouse M Cell .....	26
5.	Mechanism of Phagocytosis .....	30
6.	The Typical Fluorescence of Preopsonized <u>Salmonella typhimurium</u> C <sub>5</sub> .....	52
7.	Esterase - Staining Patterns in Peyer's Patch Cell Suspensions .....	53
8.	Ingestion Latex Particles by Peyer's Patch Macrophages .....	53
9.	Effect of the Immune Serum Concentration on the Intracellular Killing ( PP Macrophages 7 days , 1 dose ) .....	58
10.	Effect of the Immune Serum Concentration on the Intracellular Killing ( PP Macrophages 21 days , 1 dose ) .....	59
11.	Effect of the Immune Serum Concentration on the Intracellular Killing ( PP Macrophages 7 days , 3 doses ) .....	60
12.	Effect of the Immune Serum Concentration on the Intracellular Killing ( PP Macrophages 21 days , 3 doses ) .....	61
13.	Comparison of Intracellular Killing of <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> C <sub>5</sub> in Vitro by PP Macrophages of Mice Orally Immunized with <u>Salmonella typhimurium</u> G <sub>30</sub> and Control Group .....	63



## ABBREVIATIONS

BCG	=	Bacillus Calmette - Guerin
C	=	Columnar Cells
°C	=	degree Celsius
CMI	=	Cell Mediated Immunity
CTL	=	Cytotoxic T lymphocytes
DTH	=	Delayed Type Hypersensitivity
e.g.	=	example gratia (Latin) , for example
et al	=	et alli (Latin), and others
ED <sub>50</sub>	=	50 % Endpoint dilution
FCS	=	Fetal Calf Serum
FITC	=	Fluorescein Isothiocyanate
G	=	Gravity (Centrifugal force)
g	=	gram
ug/ml	=	microgram per millilitre
G-1-P	=	Glucose-1-phosphate
Gal	=	Galactose
Gal-1-P	=	Galactose-1-phosphate
GALT	=	Gut Associated lymphoid Tissue
GC	=	Germinal Center
HBSS	=	Hanks' Balanced Salt Soutlion
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-n-2-ethanesulfonic acid
hr	=	hours
IFA	=	Indirect Immunofluorescent Antibody Test
IGA	=	Immunoglobulin A
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
K cells	=	Killer cells
L	=	Lymphocytes

LD <sub>50</sub>	=	50 % Lethal dose
LPS	=	Lipopolysaccharide
M	=	Molarity
M cells	=	Membranous cells
Mac	=	Macrophages
MAF	=	Macrophage Activating Factor
mg	=	milligram
MIF	=	Migration Inhibitory Factor
min	=	minutes
ml	=	millilitre
ul	=	microlitre
mm	=	millimetre
mM	=	millimolar
N	=	Normality
NK cells	=	Natural Killer cells
nm	=	nanometre
No	=	Number
NSS	=	Normal Saline Solution
OD	=	Optical Density
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
PP	=	Peyer' s patches
RES	=	Reticuloendothelial Cell System
RNA	=	Ribonucleic acid
sec	=	second
s.c.	=	Subcutaneous
TDA	=	Thymus - dependent area
UDP	=	Uridine diphosphate
UDP - G	=	Uridine diphosphate - glucose
UDP - Gal	=	Uridine diphosphate - galactose
v/v	=	Volume by Volume
w/v	=	Weight by Volume