บทบาทของพิมบรีที่ไวต่อแมนโนสในการป้องกันโรคหัยฟอยด์ในหนู

นาย สมเกียรติ ตริตานิภากุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2531

ISBN 974-568-613-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

013793

i 17613036

The Protective Role of Mannose-Sensitive Fimbriae in Mouse Typhoid

Mr. Somkiat Tritanipakul

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
1988

ISBN 974-568-613-1

Thesis Title	The Protective Role of Mannose-Sensitive Fimbriae in Mouse Typhoid
By	Mr. Somkiat Tritanipakul
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Instructor Pakathip Reynolds, M.Sc.
Co - Advisor	Professor B.L. Reynolds, Ph.D.

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

T. Thavorn Vajrabhaya .....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhayar, Ph.D.)

Thesis Committee:

Kawee Pupaibul .....Chairman

(Associate Professor Kawee Pupaibul, M.D.)

Pakathip Reynolds .....Thesis Advisor

(Instructor Pakathip Reynolds, M.Sc.)

Bruce Reynolds .....Thesis Co-Advisor

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

Tada Sueblinvong .....Member

(Associate Professor Dr.Tada Sueblinvong)

สมเกียรติ ตริตานิภากุล : บทบาทของฟิมบรีที่ไวต่อแมนโนสในการป้องกันโรคทัยฟอยด์ในหนู (THE PROTECTIVE ROLE OF MANNOSE - SENSITIVE FIMBRIAE IN MOUSE TYPHOID) อ.ที่ปรึกษา : อ.ผกาทิพย์ เรโนลด์, 101 หน้า.

การศึกษานี้ เพื่อดูความสามารถของ type-1 fimbriae แอนติเจนของ Salmonella ในการป้องกันโรคในหนู โดยใช้ S.typhimurium F885 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหนูตะเภา แต่สามารถถูกยับยั้งด้วย D-mannose และ methyl α-D-mannopyranoside ซึ่ง mannose-sensitive fimbriae นี้ถูกตัดออกจากบัคเตรี โดยใช้เครื่อง homogenizer และเมื่อใช้วิธีการเตรียมฟิมบรีของ Dodd และ Eisenstein โดยละลายฟิมบรีใน 5 โมลาร์ ยูเรีย และทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยนำไปปั่นด้วยเครื่อง ultracentrifuge วิธีนี้ทำให้ได้จำนวนฟิมบรีที่บริสุทธิ์มากกว่าอีก 2 วิธี คือ วิธีของ Salit และ Gotschlich กับวิธีของ Knutton และคณะ เมื่อใช้เทคนิคการทำ immunoelectrophoresis และ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า ฟิมบรีที่เตรียมได้นั้นมีความบริสุทธิ์ และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 19,000 ซึ่งสามารถทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหนูตะเภาด้วย เมื่อทดสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนพบว่า มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6 นาโนเมตร

การศึกษาผลการป้องกันโรคในหนู โดยให้ $1x10^{10}$ S.typhimurium F885 หรือ E.coli F492 ทางปาก หรือให้ฟิมบรีที่เตรียมได้จำนวน 50 ไมโครกรัม ทางหน้าท้องในวันที่ 0 และทางใต้ผิวหนังในวันที่ 12 เมื่อ challenge หนูทุกกลุ่มด้วย 1,000 LD50 ของ S.typhimurium C5 ทางปากพบว่าเปอร์เซ็นต์การตายและจำนวนของ S.typhimurium C5 ในม้ามและ Payer's patches ของหนูกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย S.typhimurium F885 และฟิมบรีน้อยกว่าหนูกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย E.coli F492 และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งความสามารถในการป้องกันโรคนี้สัมพันธ์กับความสามารถของบัคเตรีที่สามารถคงอยู่ใน Payer's patches ของลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังพบว่า lipopolysaccharide ไม่มีความสำคัญในการป้องกันโรค เพราะสายพันธุ์ F885 ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการป้องกันโรคมี O แอนติเจนที่แตกต่างกับสายพันธุ์ C5 ที่ใช้ challenge

การศึกษานี้ ทำให้ได้สมมติฐานที่ว่า type-1 fimbriae ของสายพันธุ์ C5 เป็นปัจจัยที่ช่วยให้เกิดการยึดเกาะกับเยื่อบุผิวเซลล์ของลำไส้ และผลการทดลองนี้เป็นตัวอย่างหนึ่งของการใช้ฟิมบรีที่บริสุทธิ์ในการเป็นวัคซีนที่ดีและปลอดภัยได้

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา ๒๕๓๑ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

SOMKIAT TRITANIPAKUL : THE PROTECTIVE ROLE OF MANNOSE-SENSITIVE FIMBRIAE IN MOUSE TYPHOID. THESIS ADVISOR : INST. PAKATHIP REYNOLDS, 101 PP.

This study was performed to determine whether type-1 fimbriae of Salmonella were protective antigens in mice. We used a strain of S.typhimurium F885 which causes strong haemagglutination of guinea pig erythrocytes (haemagglutinating power = 3,200), which was inhibited by D-mannose, and methyl α-D-mannopyranoside.

Mannose-sensitive fimbriae were released from these bacteria by high speed blending and after the method of Dodd and Eisenstein, the fimbriae were resuspended in 5 M urea to disaggregate cell membranes and flagella, leaving the urea-resistant fimbriae intact to be further purified by ultra-centrifugation. This method was found to give higher yields than two other methods, namely that of Salit and Gotschlich, and Knutton et al. The fimbriae were found to be pure by immunoelectrophoresis criteria and by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, with an apparent subunit molecular weight of 19,000; they gave strong haemagglutination with guinea pig erythrocytes. Examined by electron microscopy, the diameters were 6 nm and retained their native morphology in the purification process.

Protective studies were carried out in groups of mice which were vaccinated orally with $1x10^{10}$ whole cells of S.typhimurium F885 of E.coli F492 or with 50 µg of fimbriae injected intraperitonealy on day 0 and subcutaneously on day 12. All groups of mice were subjected to oral challenge with 1,000 LD50 of the virulent strain, S.typhimurium C5. The percentage of deaths, and the numbers of challenge organisms in the spleen and Peyer's patches were significantly less in the S.typhimurium F885 and fimbriae immunized mice than in those of controls and E.coli F492 immunized mice. Further, there appeared to be a correlation between the protective ability of these strains and their ability to persist in the small intestinal Peyer's patches. Lipopolysaccharide (LPS) seem to plays no part in the bacterial protection, because the protective strain F885, and the challenge strain C5 carry quite different O-antigens.

These results are consistant with the hypothesis that type-1 fimbriae of strain C5 act as virulence factors by facilitating adhesion to intestinal epithelia and provides another example that purified fimbriae can serve as safe and effective vaccines.

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา ๒๕๓๑ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

This thesis would never have been successed without any heartfully supports and advices of the following persons whom I would like to express my heartful thanks to their valuable helps. Their great assistance will be memorable to me and to those who find the usefulness of this work.

My deeply appreciation to:

Instructor Pakathip Reynolds, Division of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine Chulalongkorn University, my advisor, and Profressor B.L. Reynolds, Science Division, Thai Red Cross Society (Queen Saovabha Memorial Institute), my co-advisor, for their valuable advices, strong encouragement and constructive criticisms.

Associate Professor Dr. Tada Sueblinvong, and Dr. Nuanthip Kamolvarin, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their kindness, helpful guidance of the SDS-PAGE study.

Assistant Professor Dr. Preeda Chaisiri, Department of Biochemistry, Faculty of Science, for her kindness, helpful guidance and loan of equiment needed for the ultracentrifugation study.

The staff and personel in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Scientific Division of Thai Red Cross Society, for their enthusiastic co-operation and the loan equipment needed for the laboratorial work.

The staff and personel in the Division of Medical Illustration for their valuable aid in photographic work.

The committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

Finally, I am deeply indebted to my family for their help, encouragement and understanding.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENT vi

LIST OF TABLES viii

LIST OF FIGURES ix

ABBREVIATIONS xi

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

1. Bacterial Adherence 2

1.1 Specificity of The Adherence of Bacteria to Mucosal Surfaces 3

1.2 Non-Specific Factors Influencing Bacterial Adherence 4

1.3 Specific Binding 5

2. Different Types of Fimbriae in Gram-Negative Bacilli 9

2.1 Type-1 Fimbriae 9

2.2 Type-2 Fimbriae 10

2.3 Type-3 Fimbriae 10

2.4 Type-4 Fimbriae 11

2.5 Type-5 Fimbriae 11

2.6 Type-6 Fimbriae 11

2.7 Other Fimbriae 11

3 Fimbrial Adhesins of Salmonella 12

3.1 Characterization of Type-1 Fimbriae 12

CONTENTS (Continued)

3.2 Haemagglutination Specificity and Mannose Sensitivity 13

3.3 Adhesion to Cells Other than Erythrocytes 14

3.4 Phase variation and Condition of culture. 15

3.5 Inhibition by D-Mannose and Its Analogues 16

3.6 MS Adhesive Sites on Fimbriae 18

3.7 Function of the MS Adhesin 20

4 Prevention of Bacterial Adherence 21

4.1 Application of Receptor Analogues 21

4.2 Sublethal Dose of Antibiotics 22

4.3 Antiadherence Vaccine 22

5 Fimbriae as Vaccines 23

5.1 In Vitro Studies 23

5.2 Veterinary Studies 25

5.3 Human Studies 26

6 Research Aims 27

II MATERIALS AND METHODS 29

1. Experimental Animals 29

1.1 Mice 29

1.2 Rabbits 29

2. Bacterial Strains 29

2.1 Description of Strains 29

2.2 Strain Maintenance 31

2.3 Strain Propagation 31

3. Heamagglutination Test 32

CONTENTS (Continued)

4. Heamagglutination Inhibition Test 32

5. Fimbrial Preparation 33

5.1 The Method of Dodd and Eisenstein 33

5.2 The Method of Knutton et al. 34

5.3 The Method of Salit and Gotschlich 34

6. Protein Estimation 35

7. Electron Microscopy 36

8. Determination of Fimbriae Purity and MW 36

8.1 Immunoelectrophoresis 36

8.2 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis 36

9. Immune Serum 38

9.1 Ab Against S.typhimurium F885 and E.coli F492 38

9.2 Ab Against Type-1 Fimbriae 38

10. Bacterial Agglutination 40

11. LD50 Determination 41

12. Oral Immunization and Oral Infection 41

13. Recovery and Enumeration of Bacteria from Mice 41

14. Mouse Protection Test 42

14.1 Immunization 42

14.2 Determination of Protection 42

III RESULTS 43

1. Haemagglutination Properties 43

1.1 HP and HA with GPE 43

CONTENTS (Continued)

1.2 Activity of Different Carbohydrate in HAI 43

2. Purification of Type-1 Fimbriae 48

2.1 Comparison of Purification Procedures ... 48

2.2 According to the Method of Dodd and Eisenstein 48

3. Determination of Fimbrial Purity and MW 50

3.1 SDS-PAGE 50

3.2 IEP 53

4. Distribution of Live Bacterial Vaccines in Mice After Oral Feeding 53

5. LD50 Determination 57

6. Mouse Protection Test 57

6.1 Protective Immunity Induced by Various Vaccines 57

6.2 Distribution of S.typhimurium C5 in Mice After Oral Challenge 60

IV DISCUSSION 62

REFERENCES 70

APPENDIX

I CULTURE MEDIA 88

II REAGENTS 90

BIOGRAPHY 101

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Purified bacterial fimbriae used as vaccines	24
2	Description of bacterial strains	30
3	HP and HA of GPE by various fimbriate and non-fimbriate strains	44
4	Activity of different carbohydrates in HAI of S.typhimurium F885	47
5	Comparison of type-1 fimbriae from S.typhimurium F885 by various purification procedures	49
6	HA and recovery of protein, type-1 fimbriae during purification	51
7	LD50 Determination	58
8	Resistance of mice against oral challenge with S.typhimurium C5 after immunizing with various vaccines	59

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Attachment of bacterial cells via specific adhesins to complemetary receptors on the host cell membrane	6
2	Specific blockade of bacterial adherence	8
3	Calibration curves for MW determination by SDS-PAGE	39
4	Electron micrograph of S.typhimurium F885	45
5	Electron micrograph of E.coli F492	46
6	SDS-PAGE analysis of various stages of fimbrial purification	52
7	Electron micrograph of purified type-1 fimbriae	54
8	IEP of crude Ag preparation and purified fimbriae Ag	55
9	IEP of purified fimbriae Ag demonstrating purity	55
10	The number of viable bacteria recovered from the Peyer's patches after oral feeding	56
11	The number of S.typhimurium C5 recovered from the Peyer's patches and spleen after oral challenge	61

ABBREVIATIONS

Å	=	angstrom unit
Ab	=	antibody
Ag	=	antigen
∝	=	alpha
B	=	beta
C	=	degree celsius
cm	=	centimetre
DNA	=	deoxyribonucleic acid
ed	=	editor
e.g.	=	exampli gratia (Latin), for example
et al.	=	et alii (Latin), and others
etc.	=	et cetera (Latin), and so on
Fig.	=	figure
g	=	gram
x g	=	gravity (centrifugal force)
g/cm3	=	gram per cubic-centimetre
h	=	hours
i.e.	=	id est (Latin), that is
i.p.	=	intraperitoneal
K	=	kilodaltons
LD50	=	50% lethal dose
M	=	molarity
µl	=	microlitre
µm	=	micrometre
mA	=	milli ampere

ABBREVIATIONS (Continued)

mg	=	milligram
min	=	minutes
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
nm	=	nanometre
OD	=	optical density
s.c.	=	subcutaneous
SD	=	standard deviation
sp	=	species
w/v	=	weight by volume