การตรวจหาภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อเซลล์ยุงในน้ำเหลืองคนและสัตว์ทดลอง

นางสาวอมรรัตน์ ไวทยกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1139-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20652409

DETECTION OF ANTIBODIES SPECIFIC TO MOSQUITO CELLS IN HUMAN AND ANIMAL SERUM

Miss Amornrat Waitayakul

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 2002

ISBN 974-17-1139-5

Thesis titer	Detection of Antibodies Specific to Mosquito Cells in Human and Animal Serum
By	Miss Amornrat Waitayakul
Field of study	Medical Microbiology
Thesis advisor	Dr.Thaweesak Tirawatnapong

.....

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

Suchada Kiranandana
.....Dean of Graduate school
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D)

Thesis committee

Somatat Wongsawang
.....Chairman
(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. vet)

Thaweesak Tirawatnapong
.....Thesis Advisor
(Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D)

Supatra Thongrungkiat
.....Member
(Assistant Professor Supatra Thongrungkiat)

อมรรัตน์ ไวทยกุล : การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ยุงในน้ำเหลืองคนและสัตว์ทดลอง (DETECTION OF ANTIBODIES SPECIFIC TO MOSQUITO CELLS IN HUMAN AND ANIMAL SERUM) อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ 91 หน้า ISBN 974-17-1139-5

ขณะที่ยุงกัดจะมีการปล่อยน้ำลายออกมาสู่บริเวณที่กัด โดยมีรายงานว่าพบสารหลายชนิดในน้ำลายยุง อาทิเช่น สารประเภทป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว โดยสารต่างๆเหล่านี้ส่วนมากช่วยให้การดูดเลือดเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ดังนั้นส่วนมากจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต่อน้ำลายยุงที่เป็นสารก่อให้เกิดภูมิแพ้เท่านั้น

การศึกษาในครั้งนี้มีแนวคิดที่ต่างออกมาว่า นอกจากน้ำลายแล้วขณะที่ยุงกัดจะมีเซลล์ยุงบางส่วนหลุดปะปนออกมากระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันจำเพาะขึ้นมาตอบสนองต่อเซลล์เหล่านั้นได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาโดยนำ C6/36 cell ซึ่งเป็น cell line ของยุงลาย *Aedes albopictus* ฉีดกระต่ายทดลองเพื่อกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อเซลล์ยุง และใช้เทคนิค Western blot analysis, indirect immunofluorescence assay และ ELISA ในการตรวจหาและศึกษา ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เซลล์ยุงสามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างภูมิคุ้มกันจำเพาะขึ้นมาได้จริง และพบภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ยุงในน้ำเหลืองของคนปกติ โดยทำการศึกษาในกลุ่มของพนักงานรักษาความปลอดภัย ซึ่งมีโอกาสที่จะถูกยุงกัดมากกว่าคนทั่วไป ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า เมื่อคนถูกยุงกัด เซลล์ยุงที่หลุดออกมากับน้ำลายสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันสร้างภูมิคุ้มกันจำเพาะขึ้นตอบสนองได้จริง แต่มีประเด็นที่น่าสนใจเกี่ยวข้องกับโรคไข้เลือดออกคือ เชื้อไวรัสก่อโรคไข้เลือดออกนั้น จะต้องแบ่งตัวเพิ่มจำนวนออกมาจากเซลล์ของยุงลายที่เป็นพาหะนำโรค โดยจะต้องอาศัยบางส่วนจากผนังเซลล์ของยุงมาเป็นส่วนผนังหุ้มตัวไวรัส ดังนั้นเมื่อร่างกายสามารถสร้างภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อเซลล์ยุง ภูมิคุ้มกันชนิดนี้อาจมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดภาวะทนต่อการติดเชื้อหรือลดความรุนแรงหรือเปลี่ยนแปลงลักษณะการดำเนินโรคขึ้นมาได้ ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจหาภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเซลล์ยุงในน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก ศึกษาเปรียบเทียบในกลุ่มพนักงานรักษาความปลอดภัย จากผลการศึกษาพบว่ากลุ่มพนักงานรักษาความปลอดภัยมีภูมิคุ้มกันชนิดนี้มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคไข้เลือดออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อเซลล์ยุงนี้ อาจจะมีส่วนชักนำให้เกิดภาวะทนต่อการติดเชื้อโรคไข้เลือดออก หรือทำให้การดำเนินโรคของโรคไข้เลือดออกแตกต่างกันได้ ตั้งแต่ไม่มีอาการจนถึงมีอาการรุนแรง ผลการศึกษาในครั้งนี้ อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานค้นหาแนวทางใหม่ในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออกในอนาคตได้

สหสาขา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545

4289715120 : MAJOR : MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD : ANTI-MOSQUITO / DENGUE INFECTION

AMORNRAT WAITAYAKUL : THESIS TITLE : DETECTION OF ANTIBODIES SPECIFIC TO MOSQUITO CELLS IN HUMAN AND ANIMAL SERUM THESIS ADVISOR : DR. THAWEESAK TIRAWATNAPONG, Ph.D. 91 pp. ISBN 974-17-1139-5

Most of the studied are focused on reaction of host to mosquito's saliva proteins. In this study, the host immune response to mosquito cells have been studied by developing methods for analyzing host response to mosquito cell and immune response in experimental animal. The sources of antigens that elicit antibodies could be from cells in saliva during mosquito bite. The antibodies response to mosquito cells proteins can be detected in human serum as in the experimental animal. The antibodies level is higher in groups that have high exposure to mosquito bite such as guards. The antibodies can not be detected in cord blood indicated that there is no passive transfer of maternal antibodies. These antibodies can not be detected or can found with low level in serum of patient with dengue infection.

The mosquito's membrane proteins should present in the dengue virus envelope during replication cycle in mosquitoes. Thus the mosquito antibodies present in host might modified the outcome of infection and may be one of the host factors that protect human against dengue infection or implicate in pathogenesis of dengue fever. And this might be the new strategy for vaccine development against the dengue virus infection in the future.

Inter – Department Medical Microbiology Student's signature....Amornrat.....
Field of study Medical Microbiology Advisor's signature....Thaweesak Tirawatnapong.....
Academic year 2002

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and deep appreciation to my advisor, Dr. Thaweesak Tirawatnapong for his guidance, invaluable advice supervision and encouragement throughout this work.

My sincere appreciation is express to Assoc. Prof. Suranan Tirawatnapong at Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kindness in guidance throughout the laboratory work and providing the beneficial instrument.

Grateful acknowledgement is also extended to Assist. Prof. Supathra Thongrungkiat at Department of Medical Entomology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for providing *Aedes* mosquitoes and dissecting technique.

I am extremely thankful to Assoc. Prof. Dr. Prida Malasit at Medical Molecular Biology Unit, Mahidol University, for providing C6/36 cell line.

I also wish to thanks to Assoc. Prof. Dr. Parvapan Bhattarakosol for providing Vero cell line and some chemical.

My appreciation is extended to Mr. S. Pichat Promrat for his providing rabbit blood samples, to Mrs. Pranee Srisupap for her technical lab suggestion.

Special thank are also extended to all members in inter-department of Medical Microbiology, Chulalongkorn University, for their help, kindness, sincerity and friendship.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family for their love, regard and encouragement throughout my study life. They are deserved to be mentioned as a part of my success.

CONTENTS

PAGE

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES viii

LIST OF FIGURES x

ABBREVIATIONS xi

CHAPTER

I. INTRODUCTION 1

II. OBJECTIVES 6

III. LITERATURE REVIEWS 7

I. DENGUE INFECTION 7

1.DENGUE VIRUS 7

2. THE VECTOR 8

3. TRANSMISSION OF DENGUE VIRUS 9

4. EPIDEMIOLOGY 9

5. PATHOGENESIS 10

6. CLINICAL MANIFESTATION 11

7. LABORATORY DIAGNOSIS 12

8. VACCINE DEVELOPMENT 17

II. SAND FLY AND LEISHMANIA INFECTION 18

III. ANTI-MOSQUITO ANTIBODIES 18

IV. MATHELIALS AND METHODS 20

I. MATERIALS 20

CONTENTS (continued)

1. SUBJECTS, BLOOD SAMPLES, AND CELL LINES 20

II. METHODS 21

1. IMMUNIZATION OF RABBITS 21

2. VIRAL RNA ISOLATION 22

3. RT-NESTED PCR OF DENGUE VIRAL RNA 22

4. DETECTION AND TYPING OF PCR PRODUCTS 24

5. SODIUM DODECYL SULFATE-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) 24

6. WESTERN BLOT ANALYSIS 26

7. IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY 27

8. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) 27

9. AUTOMATED DNA SEQUENCING 28

V. RESULTS 29

1. DETECTION OF PROTEIN PROFILE IN MOSQUITO CELL EXTRACTS BY SDS-PAGE 29

2. DETECTION OF ANTI-MOSQUITO CELL ANTIBODIES IN RABBIT SERUM BY WESTERN BLOT ANALYSIS 32

3. DETECTION OF ANTI-MOSQUITO CELL ANTIBODIES IN HUMAN SERUM BY WESTERN BLOT ANALYSIS 35

4. REACTIVITY OF THE ANTI-MOSQUITO CELL ANTIBODIES BY DIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY 44

5. DETECTION OF MOSQUITO CELL ANTIBODIES AGAINST MOSQUITO'S SALIVARY GLAND BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY 49

CONTENTS (continued)

6. DETECTION OF MOSQUITO CELL ANTIBODIES AGAINST MOSQUITO PROTEIN BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) 51

7. DETECTION AND TYPING OF DENGUE VIRUSES BY RT-PCR 55

VI. DISCUSSION 60

VII. CONCLUSION 69

REFERENCES 70

APPENDICES 83

APPENDIX I 83

APPENDIX II 86

BIOGRAPHY 91

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

Table. 1 Methods for dengue virus isolation 14

Table. 2 The sequences of oligonucleotide primers used for PCR amplification, DNA sequencing and typing of dengue gene. 23

Table. 3 Western blot analysis of mosquito cell's protein antigens identified by rabbit's immuned serum 34

Table. 4 Comparison of the mosquito protein's molecular weights, from different sources, identified with human's serum by Western blot analysis 40

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

Figure1 Dengue virus genome 8

Figure 2 SDS-PAGE of the mosquito's cell extracts 30

Figure 3 Electro-blotting patterns of different mosquito's cell extracts 31

Figure 4 Anti-mosquito cell antibodies in serum of experimental rabbit immunized with C6/36 cell line. 33

Figure 5 Immuno-blotting patterns of anti-mosquito cell antibodies from guard' s serum. 37

Figure 6 Immuno-blotting pattern of anti-*Aedes aegypti* whole body extract antibodies from guard' s serum. 38

Figure 7 Immuno-blotting pattern of anti-C6/36 cell extract from guard' s serum. 39

Figure 8 Immuno-blotting pattern of anti-mosquito cell antibodies from dengue patient's serum 41

Figure 9 Immuno-blotting pattern of anti-*Aedes aegypti* whole body extract antibodies from dengue patient's serum. 42

Figure 10 Immuno-blotting pattern of anti-C6/36 cell extract antibodies from dengue patient's serum 43

Figure 11 Immunofluorescence assay of preimmune rabbit's serum 45

Figure 12 Immunofluorescence assay of immuned rabbit's serum 45

Figure 13 Immunofluorescence assay of human's cord blood serum 46

Figure14 Immunofluorescence assay of guard 's serum with strong reactivity 46

Figure 15 Immunofluorescence assay of guard 's serum with weak reactivity 47

LIST OF FIGURES (continued)

Figure 16 Immunofluorescence assay of dengue patient 's serum with strong reactivity 47

Figure 17 Immunofluorescence assay of dengue patient 's serum with weak reactivity 48

Figure 18 Microscopic photograph of salivary gland of female *Aedes aegypti* mosquitoes 49

Figure 19 Immunofluorescence staining of salivary gland of female *Aedes aegypti* mosquito with rabbit anti-mosquito cell antibodies 50

Figure 20 Reactivities of rabbit anti-mosquito cell antibodies to mosquito cell in ELISA 53

Figure 21 Reactivities of human anti-mosquito cell antibodies to mosquito cell in ELISA 54

Figure22 Agarose gel electrophoresis of dengue PCR products from different serotype. 56

Figure 23 Agarose gel electrophoresis of serial dilution of recombinant plasmid. 57

ABBREVIATIONS

bp	=	base pairs
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
min	=	Minute
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
PCR	=	Polymerase chain reaction
pmole	=	Picomole
rpm	=	revolution per minute
TSR	=	Template suppressor reagent
U	=	Unit
µg	=	Microgram
µl	=	Microliter
µM	=	Micromolar
µm	=	Micrometer
FBS	=	Fetal bovine serum
TPB	=	Tryptose phosphate broth
L	=	Liter
°C	=	Degree Celsius
L-15	=	Leibovitz15
PBS	=	Phosphate buffer saline
hr.	=	hour
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine
APS	=	Ammmonium persulfate
Tris	=	Tris-(Hydroxyaminomethyl) aminomethane

ABBREVIATIONS (continued)

dNTP	=	Deoxynucleotide triphosphate
M199	=	Medium 199
s	=	second
NC	=	nitrocellulose membrane
mg	=	milligram
nm	=	nanometer
OD	=	optical density
kDa	=	kilo Dalton
ELISA	=	Enzymed linked immunosorbent assay
DFA	=	direct fluorescence assay
IFA	=	indirect fluorescence assay
ADE	=	antibody-dependent enhancement
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis