ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E42199

KINETICS OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND ANTIBODY DETECTION IN ACUTE AND CHRONIC INFECTED BALB/c MICE

MRS. NUTTIYA SRISURAT

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY
2009

b00257022

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

E42199

KINETICS OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND ANTIBODY DETECTION IN ACUTE AND CHRONIC INFECTED BALA/c MICE

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

MRS. NUTTIYA SRISURAT

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

KHON KAEN UNIVERSITY

2009

KINETICS OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND ANTIBODY DETECTION IN ACUTE AND CHRONIC INFECTED BALA/c MICE

MRS. NUTTIYA SRISURAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MEDICAL MICROBIOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2009

THESIS APPROVAL

KHON KAEN UNIVERSITY

FOR

MASTER OF SCIENCE

IN MEDICAL MICROBIOLOGY

Thesis Title: Kinetics of *Burkholderia pseudomallei* and antibody detection in acute and chronic infected BALB/c mice

Author: Mrs. Nuttiya Srisurat

Thesis Examination Committee:

Assoc. Prof. Dr. Pannika	Ritvirool	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Surasakdi	Wongratanacheewin	Member
Assoc. Prof. Dr. Rasana	Wongratanacheewin	Member
Assist. Prof. Dr. Unchalee	Tattawasart	Member

Thesis Advisors: Surasakdi Wongratanacheewin ..... Advisor

(Assoc. Prof. Dr. Surasakdi Wongratanacheewin)

Unchalee Tattawasart ..... Co-Advisor

(Assist. Prof. Dr. Unchalee Tattawasart)

L. Manmart .....

(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)

Dean, Graduate School

..... (Prof. Dr. Wiroon Laupattarakasem)

Dean, Faculty of Medicine

Copyright of Khon Kaen University

นัตฎิยา ศรีสุราช. 2552. **การตรวจหาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และแอนติบอดีในหนู BALB/c ที่ติดเชื้อแบบ เฉียบพลัน และเรื้อรังในระยะต่างๆ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน, ผศ.ดร.อัญชลี ตัตตะวะศาสตร์

บทคัดย่อ

E 42199

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิสซึ่งพบได้ในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการตายในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดจากชุมชน ปัจจุบันการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ยังคงอาศัยการเพาะเชื้อเป็นหลัก การพัฒนาการตรวจด้านภูมิคุ้มกัน และการใช้เทคนิคชีววิทยาโมเลกุล ยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนของเชื้อและระดับของแอนติบอดีในกระแสเลือดที่ตอบสนองเมื่อสัมผัสเชื้อมีน้อย ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจหาจำนวนเชื้อ *B. pseudomallei* และระดับของแอนติบอดีที่ตอบสนองเมื่อสัมผัสเชื้อในช่วงเวลาต่างๆ โดยการฉีดเชื้อ *B. pseudomallei* strain A2 จำนวน 230 และ6 CFU เข้าไปในช่องท้อง หนู BALB/c เพื่อทำให้ติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute) และเรื้อรัง (chronic) ตามลำดับ จากนั้นทำการตรวจหาเชื้อในเลือด ปอด ตับ และม้าม โดยการเพาะเชื้อ และ วิธี PCR และตรวจหาระดับแอนติบอดีที่ตอบสนองหลังรับเชื้อโดยวิธี ELISA ในช่วงเวลาต่างๆ ในกลุ่มที่ติดเชื้อแบบเฉียบพลัน สามารถตรวจพบเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อ ในเลือด ตับ และม้าม ตั้งแต่ 12 ชั่วโมงหลังจากรับเชื้อ (20%, 60%, 60% ตามลำดับ) และ โดยวิธี PCR (20%, 20%, 0% ตามลำดับ) จำนวนเชื้อในเลือดสูงสุดที่เวลา 60 ชั่วโมงหลังจากรับเชื้อ จากนั้นค่อยๆลดลง ในขณะที่ม้ามและตับพบเชื้อสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงหลังจากรับเชื้อ สามารถพบปริมาณของแบคทีเรียในม้ามได้มากและนานกว่าอวัยวะอื่นๆ ส่วนระดับแอนติบอดีที่ตอบสนองหลังจากรับเชื้ออยู่ในระดับที่ต่ำ และไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) ในการศึกษาหนูที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังโดยวิธีเพาะเชื้อพบว่าหนูส่วนใหญ่ (10/15) ไม่พบเชื้อในกระแสเลือด ส่วนที่พบเชื้อในเลือดจะพบในปริมาณที่น้อยในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 5 วัน หลังจากรับเชื้อแต่ตรวจไม่พบโดยวิธี PCR ส่วนแอนติบอดี สามารถตรวจพบในวันที่ 5 หลังจากรับเชื้อ และระดับจะขึ้นสูงสุดในวันที่ 14 และยังคงระดับอยู่ในกระแสเลือดจนถึงวันที่ 21 หลังจากรับเชื้อ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อที่หนูได้รับที่แตกต่างกันมีผลต่อความแตกต่างของจำนวนเชื้อ และระดับของแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ โดยกลุ่มติดเชื้อเฉียบพลัน (Acute) ควรเลือกใช้วิธีเพาะเชื้อ หรือวิธี PCR เนื่องจากระดับแอนติบอดียังไม่พบในกระแสเลือด สำหรับกลุ่มเรื้อรัง (Chronic) สามารถใช้วิธีการตรวจทั้งทางด้านภูมิคุ้มกัน และการเพาะเชื้อ ส่วนวิธี PCR ควรต้องพัฒนาความไวฯของการตรวจหา DNA ของเชื้อเพื่อเป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส

Nuttiya Srisurat. 2009. **Kinetics of *Burkholderia pseudomallei* and Antibody Detection in Acute and Chronic Infected BALB/c Mice.**
Master of Science Thesis in Medical Microbiology, Graduate School, Khon Kaen University

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Surasakdi Wongratanacheewin,
Assist. Prof. Dr. Unchalee Tattawasart

ABSTRACT

E 42199

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis. In Thailand, especially in the northeast, this organism is a major cause of morbidity and mortality of community-acquired septicemia. The culture technique is still a gold standard for diagnosis of melioidosis in routine laboratory. The serological and molecular methods were developed but they did not give any satisfactory result when compared to the culture. One of the reasons that make all tests unsatisfied is the lack the information of the amount and window period of *B. pseudomallei* and antibody presence in blood circulation. Therefore, in this study, the kinetic of *B. pseudomallei* and antibody were investigated using BALB/c mice as a model. The animals were infected intraperitoneally with different number of *B. pseudomallei* strain A2 for acute and chronic infection models (230 and 6 CFU respectively). The amount of the bacteria in their blood, lungs, livers and spleens were monitored by both cultures and PCR and the antibody response was analyzed by ELISA at different time intervals. In acute infection, the bacteria could be detected in blood, liver and spleen starting from 12 h after infection by culture (20%, 60% and 60% respectively) and PCR (20%, 20% and 0% respectively). The number of bacteria found in blood was peaked at 60 h after infection whereas in the spleen and liver they peaked at 48 h. The spleen was found contain higher in number of bacteria and they also persisted longer than other organs. The antibody level in mice was low and does not significantly different in each group when compared to the control group ($P > 0.05$). In chronic model, most of the infected animals gave negative blood culture (10/15). Those with bacteremia were found to have a very few number of *B. pseudomallei* during the 1st to 5th day post-infection by culture but not detectable by PCR. The titer of antibody in chronic

E 42199

infected mice could be detected after 5 days of infections and became maximum at 14th days before persisted until 21st day post-infection.

This study demonstrated the different in the number of the organisms and antibody profiles when varied the number of infecting bacteria. For acute infection, the culture or PCR method could be used for diagnosis. In chronic infection, the serology and culture would be appropriate while the PCR method still needs further development to increase the sensitivity for diagnosis in melioidosis.

Goodness portion to the present thesis is dedicated for my parents, relatives and the entire teaching staffs.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Assoc.Prof. Dr. Surasakdi Wongratanacheewin for his valuable advises, guidance, intense interest, and kindness the course in the study, and also to my co-advisor, Assist. Prof. Dr. Unchalee Tattawasart for her helpfulness, useful comments and suggestions. I deeply appreciated the time they spared me during the preparation of this thesis.

I am grateful to my thesis committee, Associate Professor Dr. Pannika Ritvirool, Associate Professor Dr. Rasana Wongratanacheewin, Assistant Professor Dr.Unchalee Tattawasart and Associate Professor Dr. Surasakdi Wongratanacheewin.

Gratefulness is also expressed to teaching staff and members in the Department of Microbiology for their practical help, providing the kindness, wonderful environment, and friendship during the time of this study.

My special thanks are expressed to my friends for their helps in any ways and also expressed to whom that may be concerned to my study, as I did not mention here.

I would like to thanks the Melioidisis Research Center, Khon Kaen University for supporting this study.

Finally, I would like to express my deepest appreciation and sincere gratitude to my family for their love, devoting, understanding, and encouragement through entire my study.

Nuttiya Srisurat

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	ii
DEDICTATION	iv
ACKNOWLEDGEMENTS	v
TABLE OF CONTENTS	vi
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1. Rationale and background	1
2. Objectives of the study	3
3. Limitations of the study	4
4. Location of research conducting	4
5. Anticipated outcome	4
CHAPTER II RELATED RESEARCH AND LITERATURE REVIEW	5
1. Background and History	5
2. Epidemiology	6
3. Bacteriology and Pathogenesis	7
4. Animal models of disease susceptibility	20
5. Clinical features and menagement of melioidosis	22
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY	36
1. Materials	36
2. Study designs	38
3. Methods	40

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

	Page
CHAPTER IV RESULTS	45
1. Kinetic of *B. pseudomallei* in blood of acute infected BALB/c mice.	45
2. Kinetic of *B. pseudomallei* in various organs of acute infected BALB/c mice.	53
3. Kinetic of *B. pseudomallei* antibody of acute infected BALB/c mice.	58
4. Kinetic of *B. pseudomallei* in blood of chronic infected BALB/c mice.	61
5. Kinetic of *B. pseudomallei* antibodies in chronic infected mice.	63
CHAPTER V DISCUSSION	65
REFERENCES	69
APPENDICES	88
RESEARCH PRESENTATION	92
VITAE	93

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	The presence of *B. pseudomallei* in acute infected BALB/c mice.	46
Table 2	The presence of *B. pseudomallei* DNA in acute infected BALB/c mice.	51
Table 3	The detection of antibodies to *B. pseudomallei* in plasma samples of infected BALB/c mice at various times after infection by ELISA using CF.	59
Table 4	Kinetic of *B. pseudomallei* in blood of chronic infected BALB/c mice.	62

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	Worldwide distribution of melioidosis.	7
Figure 2	The phylogeny of the *Burkholderia* genus.	9
Figure 3	The intracellular lifestyle of *Burkholderia pseudomallei.*	16
Figure 4	Various disease outcomes in *Burkholderia pseudomallei* infection.	26
Figure 5	Seven unique *B. pseudomallei* colony morphotypes on Ashdown's agar.	32
Figure 6	The study design of kinetic growth of *B. pseudomallei* and specific antibody responses in blood and organs of acute infected BALB/c mice	39
Figure 7	The study design of growth kinetic of *B. pseudomallei* and specific antibody responses in blood of chronic infected BALB/c mice	40
Figure 8	Kinetic of bacterial in blood of acute *B. pseudomallei* infected mice.	47
Figure 9	The percent positive in blood by culture method at various time points after infection in acute *B. pseudomallei* infected mice.	48
Figure 10	Sensitivity of the PCR for detection of *B. pseudomallei.*	49
Figure 11	The detection rate of PCR in blood of acute *B. pseudomallei* infected mice.	52
Figure 12	The bacterial loads in various organs of acute *B. pseudomallei* infected mice as determined by culture method.	54
Figure 13	The percent positive by culture method at various time points after infection in various organs of acute *B. pseudomallei* infected mice.	55

TABLE OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 14	Detection of *B. pseudomallei* DNA in blood and various organs of acute infected mice.	57
Figure 15	ELISA analysis of specific antibody responses during acute *B. pseudomallei* infected mice.	60
Figure 16	ELISA analysis of specific antibody responses in chronic *B. pseudomallei* infected mice.	64

LIST OF ABBREVIATIONS

/	Per
%	Percent
β	Beta
γ	Gamma
μ	Micro (10^{-6})
°C	Deegree Celsius
μg	Microgram(s)
μl	Microliter(s)
μM	Micromolar
μmole	Micromole
Ab	Antibody
Ag	Antigen
Ara-	L-Arabinose non-assimilator
Ara+	L-Arabinose assimilator
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Base pair(s)
C_2H_5OH	Absolute ethanol
CFU	Colony forming unit
cm	Centimeter
CO_2	Carbondioxide
CMIR	Cell-mediated immune response
DNA	Deoxyribonucleic acid
DW	Distilled water
e.g.	For example
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPS	Exopolysaccharide
et al.	Et. Alii (Latin), and other
etc.	Et. cetera (Latin), and so on
FBS	Fetal bovine serum

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

g	Gram(s)
hrs.	Hour(s)
HCl	Hydrochloric acid
HIR	Humoral immune response
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
K_2HPO_4	Potassium dihydrogen phosphate
KCl	Potassium chloride
kDa	Kilodalton(s)
l	Liter(s)
LD_{50}	Lethal dose fifty percent point
LDH	Lactase dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
mAb	Monoclonal antibody
min	Minute(s)
ml	Milliliter(s)
mm	Milliliter(s)
MNGC	Multinucleated giant cell
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MW	Molecular weight
Na_2CO_3	Sodium carbonate
Na_2HPO_4	Disodium hydrogen phosphate
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Disodium hydrogen phosphate dehydrate
NaCl	Sodium chloride
$NaHCO_3$	Sodium hydrogen carbonate

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

NaN_3	Sodium azide
NaOH	Sodium hydroxide
ND	Not determine
NG	No growth
OD	Optical density
OMP	Outer membrane protein
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMNs	Polymorphonuclear neutrophils
rpm	Round per minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
s	Second(s)
S.D.	Standard deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TLR	Toll-like receptor
TSB	Trypticase soy broth
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan-monolaurate
U	Unit
UV	Ultraviolet
V	Volt
vol/vol	Volume by volume
Wt/vol	weight by volume
W	Watt