

**USE OF BACTERIAL DNA EXTRACT FOR INDUCTION OF  
IMMUNITY TO MALARIAL PARASITE IN MICE**

**RENU WATTANALUANGARUN**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PUBLIC HEALTH)  
MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES AND EPIDEMIOLOGY  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2004**

**ISBN 974-04-4574-8  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การใช้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียในการชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียในหนูทดลอง (USE OF BACTERIAL DNA EXTRACT FOR INDUCTION OF IMMUNITY TO MALARIAL PARASITE INFECTION IN MICE)

เรณู วัฒนเหลียงอรุณ 4436080 PPH/M

วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์) สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อและวิทยาการระบาด

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จักรกริช หิรัญเพชรรัตน์, Ph.D. (Tropical Health), แพทย์พืชม  
มหารณพ, Ph.D. (Tropical Medicine), เฟื่องฟ้า อุตราชต์กิจ, วท.ม. (Public Health)

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเราทราบแล้วว่า ดีเอ็นเอของแบคทีเรียมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการป้องกันโรคติดเชื้อต่างๆ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสในการชักนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียในหนูทดลอง ประการแรกนำดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสจำนวน 34 ชนิดมาทดสอบความสามารถในการกระตุ้นเซลล์และการสร้าง IL-12 จากเซลล์พบว่า ดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสหมายเลข 24 และ 28 กระตุ้นการตอบสนองดังกล่าวได้ดีที่สุด ประการที่สองนำดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสทั้ง 2 ชนิดนี้มาทดสอบความสามารถในการชักนำให้หนูทดลองสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรีย โดยฉีดดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสในปริมาณและทางที่ให้ต่างๆ กันพบว่า ไม่มีหนูทดลองตัวใดรอดชีวิตจากการติดเชื้อมาลาเรียได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนับปริมาณเชื้อมาลาเรียในเลือดหลังจาก ได้รับเชื้อ 6 หรือ 7 วันพบว่า การฉีดดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสเข้าทางชั้นใต้ผิวหนังในปริมาณมากกว่า 100 ไมโครกรัมเพียงหนึ่งครั้งสามารถลดปริมาณเชื้อมาลาเรียในเลือดได้มากกว่าการฉีดเข้าทางหน้าท้อง การฉีดดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัส 3 ครั้งเข้าทางชั้นใต้ผิวหนังในวันที่ 0, 2 และ 4 ของการติดเชื้อไม่สามารถลดปริมาณเชื้อมาลาเรียในเลือด แต่เมื่อเพิ่มการฉีดดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสอีกหนึ่งครั้ง 4 วัน ก่อนการติดเชื้อพบว่า สามารถลดปริมาณเชื้อมาลาเรียในเลือดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) นอกจากนี้การฉีดดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัส 7 วันและ 4 วันก่อนการติดเชื้อพบว่า สามารถลดปริมาณเชื้อมาลาเรียในเลือดได้เช่นเดียวกัน ( $p < 0.01$ ) และประการที่สามทดสอบความสามารถของดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสในการเป็น adjuvant โดยการให้ร่วมกับ MSP1<sub>19</sub> และ Montanide ISA720 พบว่า ดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสสามารถส่งเสริมการสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อมาลาเรียได้ดีกว่าหนูที่ได้รับเฉพาะ MSP1<sub>19</sub> และ Montanide ISA720 โดยภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นเป็นทั้งชนิด IgG1 และ IgG2a แต่ระดับของ IgG2a เพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่มากกว่า IgG1 ดังนั้นจึงผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอของแลคโตบาซิลลัสสามารถบำบัดการติดเชื้อมาลาเรียและใช้เป็นตัวการสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันการติดเชื้อมาลาเรียได้

USE OF BACTERIAL DNA EXTRACT FOR INDUCTION OF IMMUNITY TO  
MALARIAL PARASITE INFECTION IN MICE.

RENU WATTANALUANGARUN 4436080 PHPH/M

M.Sc.(PUBLIC HEALTH) MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES AND  
EPIDEMIOLOGY

THESIS ADVISORS:CHAKRIT HIRUNPETCHARAT, Ph.D.(TROPICAL  
HEALTH), PAKPIMOL MAHANNOP, Ph.D.(TROPICAL MEDICINE),  
FUANGFA UTRARATCHKIJ, M.Sc.(PUBLIC HEALTH)

ABSTRACT

Bacterial DNA has been known to be an immunostimulatory agent to induce immunity against infectious diseases. This study aimed to evaluate *Lactobacillus* DNA for induction of immunity against blood-stage malaria infection. Firstly, thirty-four *Lactobacillus* isolates were tested *in vitro* for cell activation and induction of IL-12 production. *Lactobacillus* DNA extracts No.24 and 28 were chosen since they gave the most immune response. Secondly, both DNA extracts were investigated for their induction of immune defenses against blood-stage *P. yoelii* infection in mice. Various doses and routes of *Lactobacillus* DNA were studied for treatment of *P. yoelii*-infected mice, but no mice survived after the infection. However, results showed that for observed parasitemia at day 6 or 7 post infection a single administration of *Lactobacillus* DNA via subcutaneous injection could reduce parasitemia more than the administration via intraperitoneal injection, and the optimal dose of *Lactobacillus* DNA was >100 µg per mouse. Three dose-injections at day 0, 2, and 4 did not reduce parasitemia but an additional dose at day -4 could reduce parasitemia significantly ( $p<0.01$ ). Single dose-injection at only day -4 or -7 also reduced parasitemia significantly ( $p<0.01$ ). Finally, for use as adjuvant, mice immunized with MSP1<sub>19</sub> mixed with Montanide ISA720 and *Lactobacillus* DNA extracts enhanced protective immunity against *P. yoelii* infection, compared to mice immunized with MSP1<sub>19</sub> and Montanide ISA720. Control unimmunized mice or mice immunized only with adjuvants died within 10 days with high parasitemia. The addition of *Lactobacillus* DNA as adjuvant enhanced both IgG1 and IgG2<sub>a</sub> isotype responses, but it had more effect on IgG2<sub>a</sub> production. These findings suggested that *Lactobacillus* DNA could be used as a curative agent and adjuvant for enhancing immunity to malaria infection.

KEY WORDS :BACTERIAL DNA EXTRACT / MALARIAL PARASITE /  
CYTOKINES / ANTIBODY / MSP1<sub>19</sub>

78 pp. ISBN 974-04-4574-8