วัคซีนรวมของเชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส และเชื้อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา

นางสาวอารีรัตน์ พงษ์โสภิดา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๖

ISBN 974-561-813-6

011274

i 18306512

BIVALENT VACCINE OF *BACILLUS ANTHRACIS* AND *PASTEURELLA MULTOCIDA*

Miss. Areerat Pongsopida

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1983

Thesis Title	Bivalent Vaccine of *Bacillus anthracis* and *Pasteurella multocida*
By	Miss. Areerat Pongsopida
Department	Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.
	Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D.

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

.....S. Bunnag.....Dean of Graduate School

(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Saree Virunhaphol.....Chairman

(Assistant Professor Saree Virunhaphol)

.....Santi Thoongsuwan.....Member

(Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

.....Kriengsag Saitanu.....Member

(Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D.)

.....Aurapin Rudeechuen.....Member

(Assistant Professor Aurapin Rudeechuen)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ วัคซีนรวมของเชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส และเชื้อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา

ชื่อนิสิต นางสาวอารีรัตน์ พงษ์โสภิดา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุงสุวรรณ

อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เกรียงศักดิ์ สายธนู

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา ๒๕๒๕

บทคัดย่อ

วัคซีนรวม ๒ ชนิดของเชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส และเชื้อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา เพื่อใช้ป้องกันโรคแอนแทรกซ์ และโรคเฮโมรายิคเซพติซีเมีย ในการศึกษาวิจัยนี้ คือ ๑) วัคซีนรวมชนิดที่มี aluminum hydroxide gel และ ๒) วัคซีนรวมชนิดที่ไม่มี aluminum hydroxide gel ได้ถูกเตรียมขึ้นจาก วัคซีนเดี่ยวของสปอร์เชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส(สเตรน $34F_2$) และวัคซีนเดี่ยวของเชื้อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา (ชนิด ๖:B)

วัคซีนรวม และวัคซีนเดี่ยวแต่ละชนิด ถูกฉีดเข้าในกระต่ายกลุ่มละ ๓ ตัว ปรากฏว่า วัคซีนรวมทั้ง ๒ ชนิด และวัคซีนเดี่ยวของสปอร์เชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อสปอร์ของเชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส ได้ต่ำ ส่วนวัคซีนรวมทั้ง ๒ ชนิด และวัคซีนเดี่ยวของเชื้อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา ได้สูง ในการทดลอง passive protection ในหนูขาว ปรากฏว่า อิมมูโนโกลบูลินต่อวัคซีนรวมชนิดที่มีalum สามารถป้องกันโรคจากสปอร์เชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส ในขนาด ๗๕ เท่าของปริมาณสปอร์ที่ทำให้หนูขาวตาย ๕๐% ได้ ๓๐% เท่ากับวัคซีนเดี่ยวของสปอร์เชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส และมากกว่า วัคซีนรวมชนิดที่ไม่มีalum ซึ่งป้องกันได้เพียง ๑๕% เมื่อทดลองฉีดอิมมูโนโกลบูลินซ้ำภายหลังการฉีดสปอร์ของเชื้อแล้ว ๒๔ ชั่วโมง ความสามารถในการป้องกันโรคของอิมมูโนโกลบูลินต่อวัคซีนเดี่ยวของสปอร์เชื้อ แบซิลลัส แอนทราซิส, วัคซีนรวมชนิดที่มีalum ,และวัคซีนรวม

ชนิดที่ไม่มี alum เพิ่มขึ้นเป็น ๖๐%, ๕๐%, และ ๓๐% ตามลำดับ สำหรับอิมมูโนโกลบูลิน ต่อวัคซีนรวมแต่ละชนิด และวัคซีนเดี่ยวของเชื้อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา มีความสามารถในการป้องกันโรคจากเชื้อ พาสเจอเรลลา มัลโตซิดา ในขนาด ๑๐๐ เท่าของปริมาณเชื้อที่ทำให้หนูขาวตาย ๕๐% ได้ ๑๐๐%.

Thesis Title Bivalent Vaccine of Bacillus anthracis and Pasteurella multocida

Name Miss. Areerat Pongsopida

Thesis Advisor Assistant Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D.

Department Microbiology

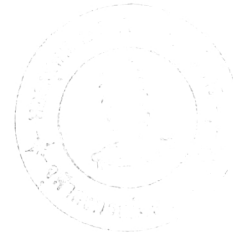
Academic Year 1982

ABSTRACT

Two types of bivalent vaccine of Bacillus anthracis and Pasteurella mutocida against anthrax and hemorrhagic septicemia were studied: 1) bivalent vaccine with aluminum hydroxide gel and 2) bivalent vaccine without aluminum hydroxide gel. They were prepared from spore vaccine of B. anthracis (strain $34F_2$) and formalin-killed vaccine of P. multocida (type 6:B).

The two types of bivalent vaccine and monovalent vaccines of each organism (Bacillus anthracis vaccine and alum-precipitated vaccine of P. multocida) were administered to each group of three rabbits. Both types of bivalent vaccine and Bacillus anthracis vaccine induced low immunity titer against B. anthracis (spore antigen) while both types of bivalent vaccine and alum-precipitated vaccine of P. multocida induced high immunity titer against P. multocida. In mouse passive protection tests, the immunoglobulin against the bivalent vaccine with alum provided 30% protection against 75 LD_{50} of B. anthracis as effective as Bacillus anthracis vaccine whereas the bivalent vaccine without alum provided only 15%

protection. When a booster dose of each immunoglobulin was administered 24 hours after challenge, the protections of mice of Bacillus anthracis vaccine, the bivalent vaccine with alum, and the bivalent vaccine without alum were increased to 60%, 50%, and 30% respectively. The immunoglobulin against each type of the bivalent vaccine and against alum-precipitated vaccine of P. multocida provided 100% protection against 100 LD_{50} of P. multocida.



ACKNOWLEDGEMENTS

I am greatly indebted and grateful to Assistant Professor Dr. Santi Thoongsuwan, Associate Dean of Administrative Affairs, and Head of the Department of Microbiology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, who devoted his valuable time for me to give numerous encouragement, guidance, suggestions and criticisms.

I am very thankful to Dr. Kriengsag Saitanu, the instructor, the Division of Microbiology, the Department of Pathology, the Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful suggestions and allowing me to use some of the equipments in his laboratory.

I wish to express my special gratitude to Dr. Pinit Supavilai, Director of the Division of Veterinary Biologics, the Department of Livestock, Ministry of Agriculture and Cooperatives, who kindly supplied me the microorganisms and to Dr. Samur Tawe-wigarn, and Dr. Kesaraporn Suwunthumma for their cooperation and help that is greatly appreciated.

Associate Professor Dr. Sorachai Pisanbud, Associated Dean of Academic Affairs, the Graduate School, Chulalongkorn University, provided excellent comments and guidance, for which I am very grateful. My special thank goes also to Assistant Professor Suppadda Pawanarith, the instructor, the Department of Mathematics, the Facultly of Sciences, Chulalongkorn University, for her useful suggestions.

I also wish to extend my sincere thanks to all the staffs members of the Department of Microbiology and Mr. Prakorb Ruangrairatanarojn, for their kindness and assistances.

Finally, a greateful acknowledgement goes to the Chulalongkorn University Graduate School which provided partly financial support for this thesis.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (Thai). iv

ABSTRACT (English). vi

ACKNOWLEDGEMENTS. viii

TABLES. xi

FIGURES. xiii

ABBREVIATIONS. xiv

CHAPTER

1 INTRODUCTION. 1

2 METERIALS AND METHODS 44

3 RESULTS. 58

4 DISCUSSION. 75

5 CONCLUSION. 79

REFERENCES. 81

VITA. 95

TABLES

TABLE		PAGE
1	Characteristics of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*	5
2	Showing the properties of the toxin component of *Bacillus anthracis*	9
3	Characters of the species of genus Pasteurella	24
4	Types of *Pasteurella multocida*	29
5	Relationship between serotype and pasteurellosis	31
6	Estimation of LD_{50} per mouse of *Bacillus anthracis*	63
7	Estimation of LD_{50} per mouse of *Pasteurella multocida*	65
8	Determination of immunoglobulin dosages for passive protection in mice against 75 LD_{50} of the spore suspension of the virulent strain of *Bacillus anthracis*	68
9	Determination of immunoglobulin dosages for passive protection in mice against 100 LD_{50} of the virulent culture of *Pasteurella multocida*	69
10	Passive protection of mice with rabbit immunoglobulins (10 mg/mouse) against 75 LD_{50} of the spore suspension of the virulent strain of *Bacillus anthracis*	71

TABLE PAGE

11 Passive protection of mice with rabbit immunoglobulins (0.625 mg/mouse) against 100 LD_{50} of the virulent culture of Pasteurella multocida 74

12 Summary of mouse passive protection test for anthrax and hemorrhagic septicemia 77

FIGURES

FIGURE PAGE

1 The antibody level of rabbit immune serum obtained from immunization with various vaccines against B. anthracis 60

2 The antibody level of rabbit immune serum obtained from immunization with various vaccines against P. multocida 61

3 Estimation of LD_{50} per mouse of Bacillus anthracis culture 64

4 Estimation of LD_{50} per mouse of Pasteurella multocida culture 66

5 Observed response of the immunized mice challenged intraperitoneally with B. anthracis for 14 days when a single dose of immunoglobulin (10 mg/mouse) obtained from rabbit immunization with various vaccine was used. 72

6 Observed response of the immunized mice challenged intraperitoneally with B. anthracis for 14 days when a booster dose of immunoglobulin (0.625 mg/mouse) obtained from rabbit immunization with various vaccine was used 73

ABBREVIATIONS

^{o}C	Degree celcius
Fig	Figure
g	Gram
hr	Hour
kg	Kilogram
LD_{50}	50% Lethal dose
μ	Micron
mg	Milligram
ml	Milliliter
M	Molarity
nm	Nanometer
%	Percent
PBS	Phosphate buffered saline
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume