4

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของอาสาสมัครที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคทัยฟอยด์ชนิดกิน (ทีวาย 21 เอ)

นางสาว กมลวรรณ สุขประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2531

ISBN 974 - 569 - 464 - 9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014483

THE IMMUNE RESPONSE IN HUMAN VOLUNTEERS AFTER ORAL VACCINATION WITH TYPHOID VACCINE (TY 21a)

MISS KAMOLWAN SUKPRASERT

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 - 569 - 464 - 9

Thesis Title	The Immune Response in Human Volunteers after Oral Vaccination with Typhoid Vaccine (Ty 21a)
By	Miss Kamolwan Sukprasert
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Instructor Pakathip Reynolds,M.Sc.
Co-Advisor	Professor B.L.Reynolds,Ph.D.
	Associate Professor Praphan PhanuPhak,M.D.,Ph.D.

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

Thavorn Vajrabhya ..... Dean of the Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhya,Ph.D.)

..... Chairman

(Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D.,Ph.D.)

Pakathip Reynolds ..... Thesis Advisor

(Instructor Pakathip Reynolds, M.Sc.)

..... Thesis Co-Advisor

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

Praphan Phanuphak (M.D.) ..... Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Praphan Phanuphak, M.D.,Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Suttipant Sarasombath, M.D.)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กมลวรรณ สุขประเสริฐ : การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของอาสาสมัครที่ได้รับวัคซีนป้องกันโรคทัยฟอยด์ชนิดกิน (ทีวาย 21 เอ) (IMMUNE RESPONSE IN HUMAN VOLUNTEERS AFTER ORAL VACCINATION WITH TYPHOID VACCINE (TY 21 A) อ.ที่ปรึกษา : อ.ผกาทิพย์ เรไนลด์, 115 หน้า.

งานที่ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ เพื่อทำการตรวจวัดประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคทัยฟอยด์ ที่ผลิตขึ้นโดยสภากาชาดไทย เปรียบเทียบกับวัคซีน Vivotif^{R} ซึ่งผลิตขายในท้องตลาดโดย Swiss Serum and Vaccine Institute วัคซีนทั้งสองชนิดนี้ ประกอบด้วย เชื้อ S.typhi สายพันธุ์ Ty2, ซึ่งขาดเอ็นไซม์ UDP-gal-4-epimerase ในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการตรวจหา secretory IgA และ systemic CMIR ในอาสาสมัครที่ได้รับวัคซีนทั้งสองชนิดนี้ นอกจากนี้ยังได้นำเอาเอ็นไซม์ urease conjugate มาใช้ศึกษาในงาน ELISA เปรียบเทียบกับ alkaline phosphatase conjugate (AP) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ในแง่ของ sensitivity และ specificity

หลังได้รับวัคซีนป้องกันโรคทัยฟอยด์ทั้ง 2 ชนิดแล้ว ไม่พบว่ามีผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ในอาสาสมัครผู้ได้รับวัคซีนเลย และจากผลการทดลองพบว่า วัคซีนทั้ง 2 ชนิด เมื่อให้เข้าไปแล้ว สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง secretory IgA ที่บริเวณลำไส้ได้ดีและยังกระตุ้นให้มี systemic CMIR สูงขึ้นกว่าก่อนได้รับวัคซีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกด้วย ส่วนปริมาณของ IgA ที่พบในน้ำเหลือง, น้ำลาย และน้ำสกัดอุจจาระ พบในปริมาณที่ต่ำและมีค่าไม่คงที่ ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการบ่งบอกถึงภาวะภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นได้

จากผลการทดลองข้างต้น พอจะสรุปได้ว่า วัคซีน Ty 21a นี้มีความสามารถในการที่จะนำไปใช้ป้องกันการเกิดโรคทัยฟอยด์ในคนได้ และนอกจากนั้นวัคซีนที่ผลิตขึ้นโดย สภากาชาดไทยนี้ มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันสามารถนำไปใช้ในการป้องกันโรคได้พอ ๆ กับวัคซีนที่มีขายอยู่ในท้องตลาดในปัจจุบัน

ในงาน ELISA พบว่า ทั้งเอ็นไซม์ urease และ AP มีความจำเพาะ (specificity) ใกล้เคียงกัน ส่วนในแง่ของความไว (sensitivity) นั้น พบว่า urease มีความไวเพียง 70% เมื่อเปรียบเทียบกับ AP เนื่องจากว่าเอ็นไซม์ urease นั้น ใช้การสังเกตสีของ substrate ที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยตาเปล่า จึงทำให้มีความไวต่ำกว่า AP อย่างไรก็ตาม ถ้าเราสามารถพัฒนาเอ็นไซม์ชนิดนี้ให้มีประสิทธิภาพดีกว่านี้ น่าจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น เช่น นำไปใช้ตามคลินิค, โรงพยาบาลเอกชน, การวิจัยภาคสนามหรือตามโรงพยาบาลท้องถิ่นต่าง ๆ เนื่องจากเป็นเอ็นไซม์ที่มีราคาถูก ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง การอ่านผลก็ง่าย จึงควรที่จะได้มีการพัฒนากันต่อไป จะทำให้งาน ELISA มีประโยชน์และนำไปใช้กันอย่างกว้างขวางยิ่งขึ้น

ภาควิชา สหสาขาวิชา

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2531

ลายมือชื่อนิสิต กมลวรรณ สุขประเสริฐ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KAMOLWAN SUKPRASERT : IMMUNE RESPONSE IN HUMAN VOLUNTEERS AFTER ORAL VACCINATION WITH TYPHOID VACCINE (TY 21 A). THESIS ADVISOR : INSTRUCTOR PAKATHIP REYNOLDS, MS.C., 115 PP.

The work reported in this thesis was aimed at evaluating the efficacy of an oral typhoid vaccine prepared by the Thai Red Cross, with that of Vivotif, a similar vaccine prepared by the Swiss Serum and Vaccine Institute. Both vaccines contain the live lyophilised *S.Typhi* Ty 21a strain an auxotrophic mutant of *S.typhi* Ty2, which lacks the enzyme UDP-gal-4-epimerase.

The immunogenicity of each oral vaccine was determined in human volunteers by measuring the secretory IgA response and systemic cell-mediated immunity.

We also took advantage of these studies to compare the specificity and sensitivity of a urease conjugate and an alkaline phosphatase conjugate in the ELISA system.

Following oral administration of each vaccine to various volunteers groups, no untoward side effects were evident.

Both stimulated the production of secretory IgA locally in the intestinal tract and systemic CMIR increased significantly compared to the initial control values.

However, the levels of specific IgA found in the serum, saliva and in stool extract was disappointingly low.

This work provided good evidence for the efficacy of Ty 21a as a vaccine against typhoid fever, and further showed that the Thai Red Cross produced vaccine performed, certainly as well as the Swiss Serum commercial vaccine.

In the ELISA system our comparison of the urease and alkaline phosphatase conjugates showed that they were equally specific. However, the sensitivity of the urease conjugate was only about 70% of that of the alkaline phosphatase.

Nevertheless, since the urease system end-point is readily measured by eye, and unlike the alkaline phosphatase, does not require measurement by a spectrophotometer, we feel that it can well be adapted for used in field trials, in country clinics, or in private hospitals, where sophisticated measuring equipment is often unavilable.

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2531

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my profound gratitude to the following persons who have helped, supported and advised me in this work.

My deepest appreciations to:

My advisor, Instructor Pakathip Reynolds, M.Sc. (University of Adelaide), Immunology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and my co-advisor Dr.B.L.Reynolds, Ph.D., Reserch Unit, Thai Red Cross Society for, their kindness, devotion, suggestions , attention and encouragement throughout my study. I thank you and am most grateful.

Dr. Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D., Immunology Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his valuable advise in dealing with the human volunteers , overwhom , he kept a watchful eye after vaccination with oral typhoid vaccines.

Dr.Somjai Reinprayoon, M.D., Bacteriology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her valuable help in assisting with certain bacteriologic cultures and their identification.

Miss Somrat Charnrit, Department of Preventive and Social Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn

University, for her kindness and suggestions for the best method for evaluation of laboratory results by statistical analysis.

We are indebted to the China Medical Board , Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for the funding of this study and to the committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the reserch grant to support this study. I faithfully acknowledge my indebtedness to them.

Armed Forces Reserch Institute of Medical Sciences (AFRIMS) , for the kindness of suppling some chemical reagents.

Miss Unchalee Chancham, an officer in the Medical library of Chulalongkorn University and all persons in the Department of Microbiology, for providing the facilities needed.

Finally, I am deeply indebted to my family for their understanding, kindly support and encouragement all my efforts. And to all those other persons, too numerous to mention who have given me support and consideration.

CONTENTS

		Page
THAI ABSTRACT		iv
ENGLISH ABSTRACT		v
ACKNOWLEDGEMENT		vi
CONTENTS		viii
LIST OF TABLES		xiii
LIST OF FIGURES		xv
ABBREVIATIONS		xvii
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
II	REVIEW OF LITERATURE	5
	Typhoid Fever	5
	Pathogenesis and Clinical Manifestation	5
	Immune Response in Typhoid Fever	8
	1. Cell-mediated Immune Response (CMIR)	8
	2. Humoral Immune Response	9
	Defense Mechanisms of the Intestinal tract	10
	1. Non-specific Defense Mechanisms	10
	1.1 Gastric Acidity	10

1.2 Mucus 11
1.3 Peristalsis 11
1.4 Normal Flora 11
1.5 Lactoferrin Lysozyme and Interferon 12
1.6 Epithelial Turnover 12
2. Specific Defense Mechanisms 13
2.1 Humoral Immune Response (HMIR) 13
2.2 IgA and secretory IgA 13
2.2.1 Structure and Chemistry of IgA 14
2.2.2 Function of IgA and sIgA 17
2.3 Cell-Mediated Immune Response 18
The Mucosal Immunity 19
1. Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) 20
2. Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT) 21
3. Peyer's Patches 22
4. Antigen Uptake by GALT 24
5. Differentiation and Homing of Lymphocytes 27
Typhoid Vaccines 30
I. Parenteral-inactivated typhoid vaccines 30
1. Whole-cell vaccines 30
2. Cell-Free vaccines 30
II. Oral typhoid vaccines 31

1. Killed or inactivated vaccines ... 31
2. Live or attenuated vaccines 31
Parenteral-killed typhoid vaccines 31
Oral typhoid vaccines 32
S.typhi strain Ty 21a (gal E mutant) 34
Controlled Field Trial of Oral Typhoid Vaccines 36
III. MATERIALS AND METHODS 38
Materials 39
1. Human Volunteers 39
2. Vaccines 39
3. Microtiter Plates 40
4. Polyethylene petri-dishes 41
Methods 41
1. Vaccination Schedule 41
2. Collection and Storage Specimens 41
2.1 Heparinized blood for LMI 41
2.2 Serum 42
2.3 Intestinal Lavage 42
2.4 Saliva 43
2.5 Stool Extract 43
3. Preparation of Antigen 44
4. Leukocyte Migration Inhibition Test .. 45
5. ELISA 46
5.1 Method of Coupling Antigen to enzyme 47
5.2 Determination of Conjugate Activity 48

5.3 ELISA METHOD 48

IV RESULTS 50

1. The Volunteers and types of vaccination 51

2. Stool examination after vaccination .. 53

3. The Volume, input and output of isotonic solution 53

4. The Optimal Conditions in the ELISA method used 53

4.1 The Determination of the activity and working dilution of alkaline phosphatase conjugate 55

4.2 The Determination of the activity and working dilution of Urease conjugate 55

4.3 Determination of the optimal Concentration of crude LPS 55

4.4 The Optimal Temperature and Time for incubation 58

4.4.1 Serum IgA 58

4.4.2 Saliva IgA 58

4.4.3 Intestinal lavage IgA 58

4.4.4 Stool Extract IgA 58

4.5 The Incubation with Conjugate ... 63

5. The leukocytes migration inhibitions index 63

6. The Serum IgA anti-CLPS response 70

7. The Saliva IgA anti-CLPS response 70

8. The Stool extract IgA anti-CLPS response 70

9. The intestinal lavage IgA anti-CLPS response 80

10. A Comparison of Urease and Alkaline phosphatase as coupled enzyme in the ELISA 80

V DISCUSSION 86

REFERENCES 95

APPENDIX I 112

APPENDIX II 113

BIOGRAPHY 115

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Twenty-volunteers were divided into two groups by the types of oral vaccines....	52
2.	Comparison of the volume of isotonic solution input and output.....	54
3.	ELISA method:Procedure for Determination of specific IgA anti-CLPS by alkaline phosphatase.....	65
4.	ELISA method:Procedure for Determination of specific IgA anti-CLPS by Urease.....	66
5.	LMI index in vaccinees who received two different typhoid vaccines.....	67
6.	The systemic serum IgA in vaccinees who received two different typhoid vaccines	71
7.	The saliva IgA in vaccinees who received two different typhoid vaccines.....	74
8.	The stool extract IgA in vaccinees who received two different typhoid vaccines	77
9.	The local intestinal lavage IgA in vaccinees who received two different typhoid vaccines.....	81
10.	The specific IgA from various sources in vaccinees who received two different typhoid vaccines before and after vaccination.....	82

11. Comparison of the activity of urease and alkaline phosphatase conjugate..... 85

12. Sensitivity and specificity of urease compared with alkaline phosphatase..... 86

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Report Cases of Enteric Fever	2
2.	Schematic representation of IgA	15
3.	Diagram of Peyer's patches structure ..	23
4.	A summary of the stages involved in the transport of antigen by the " M cell "	24
5.	Circulation of enteric immunocytes	29
6.	Schematic representation of the metabolic events presumed to occur when Ty 21a was grown in the presence of galactose	36
7.	Diagram Method for ELISA	50
8.	The determination of the activity and working dilution of alkaline phosphatase conjugete	56
9.	Determination of optimal concentration of CLPS	57
10.	Kinetics of IgA in serum binding to CLPS coated plates	59
11.	Kinetics of IgA in saliva binding to CLPS coated plates	60
12.	Kinetics of IgA in intestinal lavage to CLPS coated plates	61
13.	Kinetics of IgA in stool extract binding to CLPS coated plates	62
14.	Kinetics of alkaline phosphatase conjugate binding	64

15. The specific LMI index before and after vaccination with Ty 21a 68

16. The individual LMI index of vaccinees in Vivotif ® and Thai Red Cross groups 69

17. The specific serum IgA in Vivotif ® and Thai Red Cross groups 72

18. The individual serum IgA in Vivotif ® and Thai Red Cross groups 73

19. The specific saliva IgA in Vivotif ® and Thai Red Cross groups 75

20. The individual saliva IgA in Vivotif ® and Thai Red Cross groups 76

21. The specific stool extract IgA in Vivotif ® and Thai Red Cross groups 78

22. The individual stool extract IgA in Vivotif ® and Thai Red Cross groups 79

23. The specific local intestinal lavage IgA in Vivotif ® and Thai Red Cross groups.. 82

24. The individual intestinal lavage IgA in Vivotif ® and Thai Red Cross groups 84

ABBREVIATION

AP	=	Alkaline Phosphatase
B	=	B-lymphocyte
BALT	=	Bronchus-associated Lymphoid Tissue
BCP	=	Bromocresol-purple
^{o}c	=	degree celsious
CMIR	=	Cell-mediated Immune Response
CLPS	=	Crude lipopolysaccharide
DTH	=	Delayed-type Hypersensitivity
D.W.	=	Distilled Water
e.g.	=	example gratia (Latin), for example
ELISA	=	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al	=	et alli (Latin) and other
g	=	gram
G30	=	Salmonella typhimurium strain G30
GALT	=	Gut-associated Lymphoid Tissue
GC	=	Germinal Center
GI	=	Gastrointestinal tract
hr	=	hour
HIR	=	Humoral-immune Response
IgA	=	Immunoglobulin A
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
J	=	J-chain
K cells	=	Killer cells
kdal	=	kilodalton
LMIR	=	Leukocyte Migration Inhibition
LPS	=	Lipopolysaccharide

MALT	=	Mucus-associated Lymphoid Tissue
M cell	=	Membranous cells
mg	=	milligram
mg/ml	=	milligram per milliliter
min	=	minute
ml	=	milliliter
nm	=	nanometer
NO.	=	number
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
PEG	=	Polyethyleneglycol
PP	=	Peyer's patches
RANase	=	Ribonuclease
rpm	=	rotate per minute
RT	=	Room Temperature
sec	=	second
SC	=	Secretory Component
sIgA	=	secretory Immunoglobulin A
T	=	T-lymphocyte
Ty 21a	=	Salmonella typhi strain Ty 21a
TDA	=	Thymus-dependent Area
UDP	=	Uridine-diphosphate
UDP-G	=	Uridine-diphosphate Glucose
UDP-GAL	=	Uridine-diphosphate Galactose
µ	=	micron, micrometer
µg	=	microgram
µg/ml	=	microgram per milliliter
µl	=	microliter