การศึกษาพยาธิสภาพของการติดเชื้อ ซูโดโมแนส แอรูจิโนซ่า ในสัตว์ทดลอง

น.ส. นิภาพร กังสกุลนิติ

001272

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2522

I15933468

STUDIES ON PATHOGENESIS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN EXPERIMENTAL ANIMALS

Miss Nipaporn Kungsckulniti

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

1979

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาพยาธิสภาพของการติดเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซ่าในสัตว์ทดลอง
โดย	น.ส. นิภาพร กังสกุลนิติ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิสวาท ทุติยะโพธิ)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ม.ล. ประนต ชุมแสง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุมนา วรรธนะภูติ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาพยาธิสภาพของการติดเชื้อซูโดโมแนส แอรูจิโนซ่าในสัตว์ทดลอง

ชื่อ น.ส. นิภาพร กังสกุลนิติ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2522

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Exotoxin ของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa สามารถที่จะทำให้เข้มข้นโดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate และทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนได้โดยการใช้ Sephadex G-200 Column Chromatography หลังจากการทำให้เข้มข้นแล้วผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้มีโปรตีน 19.62 micrograms ต่อหนึ่งขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตาย 50% สิ่งเตรียมนี้ประกอบด้วยโปรตีนที่สามารถที่กระตุ้นให้เกิด antibodies สองชนิด ซึ่งเห็นได้จาก optical density profile และสนับสนุนด้วยผลจากการทำ gel diffusion test

พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของหนูถีบจักรที่ถูกฉีดเข้าช่องท้องด้วย exotoxin แสดงให้เห็นชัดถึงการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของตับ ม้าม และไต ลักษณะผิดปกติที่พบในอวัยวะเหล่านี้ คือ necrosis, cellular swelling และการเพิ่มของ fatty acid granules ภายในเซลล์ การตรวจโดย direct immunofluorescent antibody technique แสดงให้เห็นการกระจายของจุดเรืองแสงภายใน cytoplasm ของเซลล์ของอวัยวะเหล่านี้

7.13 micrograms ของ immune globulin สามารถที่จะใช้ยับยั้งพิษของ exotoxin ของเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ในขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตาย 50% อย่างได้ผล

Thesis Title Studies on Pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa in Experimental Animals

Name Miss Nipaporn Kungsckulniti

Thesis Advisor Assistant Professor Santi Thoongsuwan Ph.D

Department Microbiology

Academic Year 1979

ABSTRACT

Exotoxin of Pseudomonas aeruginosa could be concentrated by precipitation with ammonium sulfate and was partially purified by Sephadex G-200 column chromatography, after concentration the final product contained 19.62 mcg. of protein per one LD_{50} for mice. The preparation consisted of two immunogenic protein species as shown in optical density profile and confirmed by gel diffusion test.

The histopathology of mice inoculated intraperitoneally with exotoxin were markedly demonstrated by histo-microscopic changes in the liver, spleen and kidney cells. The abnormalities of these organs were characterized by necrosis, cellular swelling and increasing of fatty acid granules. Direct immunofluorescent antibody techique demonstrated the distribution of spotty fluorescence in the cytoplasmic region of these organs.

7.13 mcg. of immune globulin was effectively used to neutralize 50% lethal dose of Pseudomonas aeruginosa exotoxin per mouse.

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my appreciation to Assistant Professor Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her kindness and fruitful guidance throughout the course of this work.

I am deeply indebted and grateful to Assistant Professor Dr. Santi Thoongsuwan, Secretary of the Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for his helpful guidance, suggestions, criticisms and encouragement throughout the course of this study.

I should also like to extend my deep gratitude to Professor M.L. Pranod Xumsaeng, Head of the Department of Food Chemistry, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, and Col. Dr. Saisudchai Tuchinda, Head of the Department of Nuclear Medicine, Phramongkutklao Hospital, for their kind cooperation in allowing me to use some of the equipments in their Departments.

I am mostly thankful to Miss Kleophant Thakerngpol, the Instructor, the Department of Pathology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, for granting me the opportunity to carry out some parts of this work.

I also wish to extend my sincere thanks to all the staff-members of the Department of Microbiology for their kindness and assistances.

Least of all, I am deeply obliged to the Chulalongkorn University Graduate School, for granting me part of the financial support (eight thousand Baht) to conduct this project.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai)	IV
ABSTRACT (English)	V
ACKNOWLEDGEMENTS	VI
TABLES	IX
FIGURES	X
ABBREVIATIONS	XII
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II MATERIALS AND METHODS	13
III RESULTS	28
IV DICUSSION	44
V CONCLUSION	48
REFERENCES	50
VITA	57

TABLES

TABLE		PAGE
1	Toxicities of various products of Pseudomonas aeruginosa compared with other bacterial toxin	7
2	Comparison between growth and production of toxin of Pseudomonas aeruginosa (strain PA-103)	11
3	Estimation of LD_{50} per mouse of Pseudomonas aeruginosa exotoxin	31
4	The in vitro and in vivo testing of exotoxin neutralization	45

FIGURES

FIGURE		Page
1	Effect of yeast RNA on growth and toxin production by *Pseudomonas aeruginosa* (strain PA-103).....	12
2	The optical density at 280 nm. of the gel fraction-ation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin.....	29
3	Estimation of the protein content of exotoxin and immune globulin.....	30
4	Liver sections	
	A. Normal mouse liver.....	33
	B. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin treated mouse liver.....	34
	C. Progressive necrosis of hepatocytes in liver of treated mouse.....	35
5	Kidney sections	
	A. Normal mouse kidney.....	36
	B. Focal proliferation of mesengial cell in kidney of treated mouse.....	37
6	Spleen sections	
	A. Normal mouse Spleen.....	38
	B. Multinucleated giant cells formation in the spleen of treated mouse.....	39

FIGURE Page

7 Double immunodiffusion test in gel of Pseudomonas aeruginosa crude exotoxin against homologous rabbit immune globulin..... 41

8 Immunofluorescence of exotoxin treated mouse kidney. 42

ABBREVIATIONS

ADP	Adenosine diphosphate
cm	Centimeter
cm^2	Square centimeter
EF_2	Elongation factor 2
g	Gram
H & E	Hematoxylin and Eosin
kg	Kilogram
LD_{50}	50% lethal dose
M	Molarity
μ	Micron
mcg	Microgram
mg	Milligram
ml	Millilitre
mm^3	Cubic millimeter
N	Normality
NAD	Nicotinamide adenosine dinucleotide

nm	Nanometer
NSS	Normal Saline Solution
OD	Optical Density
PBS	Phosphate buffered saline
rpm	Revolutions per minute
sec	Second
V/V	Volume by volume